

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALESSANDRA BECKER FINCO

**AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA, MORFOLÓGICA E
CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DE
Acanthamoeba POR ANTICORPOS POLICLONAIS E
MONOCLONAIS**

CURITIBA

2012

ALESSANDRA BECKER FINCO

**AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA, MORFOLÓGICA E
CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DE
Acanthamoeba POR ANTICORPOS POLICLONAIS E
MONOCLONAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Área de Concentração: Patologia. Departamento de Patologia Básica. Setor de Ciências Biológicas do Campus Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Larissa M. Alvarenga

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a Adriana Oliveira Costa
Prof^a. Dr^a Juliana F. de Moura

CURITIBA

2012



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA, MORFOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO
IMUNOQUÍMICA DE *Acanthamoeba* POR ANTICORPOS
POLICLONAIS E MONOCLONAIS”**

por

ALESSANDRA BECKER FINCO

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

Prof^a. Dr^a. Larissa Magalhães Alvarenga (presidente)

Prof. Dr. Juliano Bordignon

Prof^a. Dr^a. Larrisa Reifur

Curitiba, 20 de março de 2012.

AGRADECIMENTOS

À coordenação da pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Larissa Magalhães Alvarenga pela oportunidade concedida, pelo exemplo, pela amizade e pelo seu tempo dedicado ao meu aprendizado.

Aos professores que fizeram mais do que apenas ensinar conceitos, contribuindo para que eu desenvolvesse o gosto pela pesquisa, entre eles Prof^a. Dr^a. Adriana Costa e Prof^a. Dr^a. Juliana Moura.

Aos antigos amigos do Laboratório de Imunoquímica: Janaína, Silvana, João, Luis, Carlinha, Ana e Ronaldo que me acompanharam no início dessa jornada.

Às minhas amigas de laboratório Sabrina, Camila, Juliani, Carine e Rafaela que tornaram os dias de pesquisa muito mais divertidos.

Às amigas que fiz durante o mestrado e pretendo levar por toda vida “Francesbiela”, “Dérbeli” e “Juju Seger”.

Aos meus pais pelo grande amor por mim demonstrado das mais diversas maneiras. Sem eles com certeza eu não chegaria até aqui.

À minha irmã e melhor amiga Fabiana por estar sempre ao meu lado.

Em especial, à minha filha Luana que me dá forças para seguir em frente e não desanimar nem desistir nunca.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a atingir este objetivo.

MUITO OBRIGADA A TODOS!!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Histórico sobre <i>Acanthamoeba</i>	3
2.2 Distribuição, ciclo de vida e morfologia de <i>Acanthamoeba</i>	4
2.3 Classificação taxonômica	6
2.4 Infecções por <i>Acanthamoeba</i> no ser humano	8
2.4.1 Úlcera Cutânea	9
2.4.2 Encefalite Granulomatosa Amebiana	10
2.4.3 Ceratite por <i>Acanthamoeba</i>	11
2.5 Mecanismos de infecção	13
2.6 Resposta imune	15
2.7 Técnicas de Identificação molecular de isolados de <i>Acanthamoeba</i>	16
3. OBJETIVOS	18
3.1 Geral	18
3.2 Específicos	18
4. METODOLOGIA	19
4.1 Descrição das amostras de <i>Acanthamoeba</i>	19
4.2 Análises Fisiológicas e Morfológicas de <i>Acanthamoeba</i>	20
4.2.1 Curva de Crescimento de trofozoítos	20
4.2.2 Velocidade de encistamento	20
4.2.3 Análise morfológica dos trofozoítos através da Microscopia Eletrônica de Varredura	21
4.4 Obtenção dos antígenos solúveis	22

4.4.1 Obtenção do antígeno bruto de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i>	22
4.4.2 Sonicação	22
4.5 Quantificação dos antígenos solúveis	22
4.5.1 Dosagem de proteínas	22
4.6 Caracterização Imunoquímica	23
4.6.1 Produção de anticorpos policlonais	23
4.6.2 Produção de anticorpos monoclonais	23
4.6.3 Eletroforese	25
4.6.4 ELISA para titular anticorpos	26
4.6.5 <i>Western Blot</i>	26
4.6.6 Imunofluorescência	27
4.7 Análise estatística	28
5. RESULTADOS	29
5.1 Perfil de crescimento em meio PYG	29
5.2 Velocidade de encistamento	32
5.3 Morfologia de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> observada por microscópio eletrônico de varredura (MEV)	33
5.4 Caracterização protéica visualizada por Eletroforese	35
5.5 Caracterização dos anticorpos policlonais	36
5.6 Caracterização dos anticorpos monoclonais	41
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	53
8. PERSPECTIVAS	55
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> .	5
Figura 2. Secção coronal de hemisfério cerebral humano com necrose cortical e subcortical de caso humano de encefalite granulomatosa amebiana fatal.	10
Figura 3. Ceratite amebiana.	12
Figura 4. Patofisiologia da ceratite amebiana.	13
Figura 5. Cinética de crescimento de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> .	29
Figura 6. Comparação do padrão de crescimento das amostras clínicas e ambientais.	31
Figura 7. Cinética de formação de cistos de <i>Acanthamoeba</i> em meio NEFF.	32
Figura 8. Microscopia Eletrônica de Varredura de trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> .	33
Figura 9. Número de acantopódios observados nos isolados clínicos (AP2 e AR) e nos isolados ambientais (AP4 e AR11).	34
Figura 10. Eletroforese de proteínas de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> em gel de poliacrilamida.	35
Figura 11. Titulação dos soros dos camundongos imunizados com os antígenos de <i>Acanthamoeba</i> , por ELISA indireto.	36

Figura 12. Reatividade cruzada dos anticorpos policlonais, produzidos contra os antígenos de <i>Acanthamoeba</i> AP4, AP2, AR e AR11, por ELISA indireto.	37
Figura 13. Reatividade dos anticorpos policlonais contra antígenos de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> por <i>Western blotting</i> .	38
Figura 14. Imunofluorescência indireta com os anticorpos policlonais.	39
Figura 15. Imunofluorescência indireta soro murino pré-imune.	40
Figura 16. Reatividade dos anticorpos monoclonais, produzidos contra o antígeno de AR, por ELISA indireta.	42
Figura 17. <i>Western Blotting</i> do anticorpo monoclonal mAb3.	44
Figura 18. Imunofluorescência indireta com o anticorpo monoclonal 3 (mAb3) frente aos trofozoítos das quatro amostras.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das principais espécies de <i>Acanthamoeba</i> de acordo com os grupos morfológicos descritos por Pussard e Pons (1977).	7
Tabela 2: Isolados clínicos e ambientais de <i>Acanthamoeba</i> .	19
Tabela 3. Taxa média de crescimento de culturas de <i>Acanthamoeba</i> com inóculo de 10^5 trofozoítos por mL.	30
Tabela 4. Reatividade de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais produzidos contra o antígeno clínico de <i>Acanthamoeba</i> AR verificada pelo ensaio de ELISA.	41
Tabela 5. Reatividade dos anticorpos monoclonais frente aos dois isolados clínicos e aos dois isolados ambientais, por ELISA indireto.	43

RESUMO

As amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* encontram-se amplamente distribuídas na natureza e são consideradas organismos potencialmente patogênicos. Ocasionalmente podem desencadear infecções humanas, como a encefalite amebiana granulomatosa e a ceratite amebiana. A investigação de características diferenciais entre as linhagens patogênicas e aquelas não associadas à infecção pode auxiliar a determinar fatores relacionados à patogenicidade e desenvolvimento de testes de diagnóstico. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente, por meio de critérios fisiológicos, morfológicos e imunoquímicos, amostras clínicas e ambientais de *Acanthamoeba*. Trofozoítos de quatro isolados foram utilizados: uma amostra clínica, obtida de caso de ceratite amebiana, outra amostra ambiental, obtida da poeira da residência do mesmo paciente, e outras duas amostras de referência *A. poliphaga* #2, de ceratite amebiana (ATCC 30641) e *A. poliphaga* #4, de água de um lago (ATCC 30782). Os quatro isolados foram cultivados axenicamente em meio PYG (proteose-peptona, extrato de levedo e glicose) usados para análise por microscopia eletrônica de varredura e submetidos individualmente à lise em ultra-som para obtenção de extrato protéico bruto. Os extratos foram utilizados para determinação do perfil protéico por eletroforese e na imunização de camundongos para produção anticorpos policlonais e monoclonais. Os anticorpos produzidos foram caracterizados por ELISA, *Western Blotting* e imunofluorescência. A análise do perfil protéico apresentou distinções quanto à presença e expressão de algumas proteínas entre os isolados. Os resultados obtidos com os anticorpos policlonais sugerem a presença de proteínas específicas para cada uma das amostras estudadas, além de um perfil imunoquímico com anticorpos co-reativos para componentes conservados. Dez clones de anticorpos monoclonais foram obtidos, dos quais o mAb3 reconhece proteínas de três das quatro amostras estudadas. O conhecimento adquirido com a realização desse trabalho poderá ser empregado na padronização de novos critérios para identificação e caracterização de linhagens desse gênero. Além disso, permitirá que proteínas previamente caracterizadas imunoquimicamente possam ser utilizadas como marcadores de patogenicidade.

Palavras - chaves: *Acanthamoeba*, ceratite amebiana, perfil protéico, anticorpos policlonais e monoclonais, patogenicidade.

ABSTRACT

The free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba* are widely distributed in nature and are considered potentially pathogenic organisms. Occasionally they can trigger human infections such as granulomatous amoebic encephalitis and amoebic keratitis. The investigation of differentiating characteristics between pathogenic strains and those not associated with infection may help to determine factors related to pathogenicity and the development of diagnostic tests. In this sense, the aim of this study was to perform a comparative evaluation; by means of physiological, morphological and immunochemical criteria; between clinical and environmental samples of *Acanthamoeba*. Trophozoites of four isolates were used: a clinical sample, obtained from a confirmed case of amoebic keratitis; an environmental sample, obtained from the dust of the residence of the same patient; and two reference samples *A. poliphaga* #2, obtained from an amoebic keratitis (ATCC 30641) and *A. poliphaga* #4, obtained from the water of a lake (ATCC 30782). The four isolates were axenically grown in PYG (proteose-peptone, yeast extract and glucose), used for analysis by scanning electron microscopy and individually submitted to lysis by ultrasound to obtain a crude protein extract. The extracts were used to determine the protein profile by electrophoresis and were used for the immunization of mice to produce polyclonal and monoclonal antibodies. The antibodies produced were characterized by ELISA, *Western Blotting* and Immunofluorescence. The analysis of the protein profile presented distinctions about the presence and expression of some proteins among the isolates. The results obtained with polyclonal antibodies suggest the presence of specific proteins for each of the studied samples, besides an immunochemical profile with co-reactive antibodies to conserved components. Ten clones of monoclonal antibodies were obtained, from which mAb3 recognizes three of the four samples studied. The knowledge acquired from the development of this work may be employed at the standardization of new criteria for identification and characterization of strains from this genus. Furthermore, it can enable that previously immunochemically characterized proteins could be used as markers for pathogenicity.

Keywords: *Acanthamoeba*, amoebic keratitis, protein profile, polyclonal and monoclonal antibodies, pathogenicity.

1. INTRODUÇÃO

As amebas do gênero *Acanthamoeba* são protozoários aeróbios, que podem ser encontrados nos mais variados ambientes e em todos os continentes (MARCIANO CABRAL e CABRAL, 2003). As espécies desse gênero apresentam no seu ciclo de vida uma fase trofozoítica, ativa, que se alimenta e se reproduz; e uma forma cística quando as condições são desfavoráveis, como a falta de nutrientes, alteração de pH ou de temperatura e dessecação (PAGE, 1967; BOWERS e KORN, 1979). Podem viver de forma livre ou parasitária, sendo assim denominadas como organismos anfizóicos (ALVARENGA *et al*, 2000; NARAYANAN, 2010).

Quando associados à infecção no ser humano, as amebas do gênero *Acanthamoeba* podem causar infecções oportunistas, que na maioria dos casos atingem o sistema nervoso causando a encefalite amebiana granulomatosa. A infecção tem curso crônico e é de difícil diagnóstico e tratamento, atingindo principalmente indivíduos imunocomprometidos (ALVARENGA *et al*, 2000; NARAYANAN, 2010; STEHR-GREEN *et al*, 1989).

Acanthamoeba também é causadora de uma grave infecção de córnea, a ceratite amebiana (CA), cuja ocorrência vem aumentando nos últimos anos, especialmente dentre os usuários de lentes de contato. O diagnóstico e tratamento na maioria das vezes não são realizados precocemente, pois a doença pode ser confundida com infecções por outras etiologias, além de haver dificuldade de reconhecer o agente nos materiais de raspado. A CA é uma infecção invasiva da córnea, que se caracteriza por uma perda gradual da acuidade visual, chegando em alguns casos, a provocar cegueira. Neste caso, as infecções de córnea não estão associadas a indivíduos imunodeprimidos, mas principalmente, a usuários de lentes de contato. O mecanismo de infecção por *Acanthamoeba* envolve uma série de processos prévios, como a adesão do trofozoíto às células do epitélio do hospedeiro, secreção de proteases para a desorganização do tecido e por último a fagocitose celular (ALVARENGA e FREITAS, 2003; OBEID *et al*, 2003; PANJWANI, 2010).

Além da lacuna existente relacionada à dificuldade de diagnosticar precocemente a CA existe ainda outra dificuldade na identificação destas amebas. A diferenciação entre as espécies de *Acanthamoeba* é feita com base na morfologia dos cistos por microscopia óptica, porém este critério é confuso e apresenta variações que comprometem a identificação. Por este motivo, critérios moleculares,

utilizando técnicas de seqüenciamento gênico, têm sido usados para diferenciar genótipos do protozoário. Contudo, através da inspeção da seqüência do genoma não é possível obter informação sobre o nível de expressão de genes, ou sobre características das proteínas expressas, tais como o seu tempo de meia vida, a sua localização sub-celular, eventuais modificações pós-tradução, interações proteína-proteína e proteína-DNA, a estrutura e a função biológica das proteínas. A análise da expressão global através do proteoma (todas as proteínas do genoma) permite revelar proteínas (ou seus genes codificantes) envolvidas em processos dinâmicos que ocorrem após a perturbação de um dado estado fisiológico, através da comparação da sua concentração celular, antes e após essa perturbação (SCHROEDER *et al*, 2001).

No caso das amebas do gênero *Acanthamoeba*, a avaliação da expressão protéica e estudo antigênico deste protozoário, fornecem uma perspectiva promissora na sua diferenciação e favorecem o diagnóstico precoce da infecção (FREDERICK *et al*, 2004). As análises de propriedades bioquímicas e imunológicas das proteínas podem fornecer informações importantes sobre possíveis marcadores de patogenicidade (moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico), além de permitirem a caracterização de antígenos estágio-específicos, o que é relevante considerando que o ciclo de *Acanthamoeba* envolve duas formas evolutivas (cisto e trofozoíto) (GARATE *et al*, 2004; WALOCHNIK *et al*, 2004; TURNER *et al*, 2005).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico sobre *Acanthamoeba*

O interesse pelo estudo das amebas surgiu no início do século 20, quando Schaudinn (1903) descreveu o protozoário *Entamoeba histolytica* como causador da amebíase intestinal. Até então, acreditava-se que esta era a única ameba patogênica para o homem. Anos depois, a equipe de Culbertson (1958) durante a realização de ensaios para verificar a segurança de vacinas da poliomielite perceberam o aparecimento de colônias em cultura de células usadas para preparar a vacina. Acreditava-se que poderiam ser vírus pois a inoculação do fluído dessas culturas de células em ratos e macacos provocava a morte desses por encefalite. A partir do cultivo de células de rim desses macacos, isolou-se um novo agente patogênico desconhecido até o momento. Tratava-se de uma ameba diferente das comumente encontradas parasitando o intestino, e a classificaram como *Acanthamoeba culbertsoni*. Ela era capaz de produzir um efeito citopatogênico em cultivo celular e uma vez inoculada por via intranasal ou intracerebral em ratos, produzia em poucos dias uma meningoencefalite mortal (JAHNES *et al*, 1957; CULBERTSON *et al*, 1958).

Casos humanos de encefalite amebiana foram relatados logo depois na Austrália, Europa, África, América do Sul e Estados Unidos. Fowler e Carte (1965) descreveram na Austrália quatro casos de meningite mortal em humanos e identificaram o agente patogênico causador, como uma *Acanthamoeba* similar àquela descrita por Culbertson (1958). No entanto, alguns desses casos foram identificados mais tarde como meningoencefalite amebiana primária, uma doença fatal do sistema nervoso central causada por outra ameba de vida livre ameba, *Naegleria fowleri*. Os primeiros casos em que *Acanthamoeba* foi claramente estabelecida como agente causador de doenças em humanos foram registrados no início de 1970, sendo que estes incluíram relatos de encefalite amebiana, ceratite amebiana, e infecções de pele (NAGINGTON *et al*, 1974; JONES *et al*, 1975).

Nagington *et al* (1974) descreveram no Reino Unido dois casos de ceratoconjuntivite em pacientes com infecção ocular moderada tido como uveíte que não responderam ao tratamento. Meses depois, foram isoladas amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* nas lesões oculares. Jones *et al* (1975), descreveu um

caso de ceratite provocada por *A. polyphaga*, com posterior comprometimento do sistema nervoso central.

No Brasil, os primeiros relatos de infecção por amebas de vida livre (AVL) datam de 1971, quando Foronda (1971) isolou organismos com características semelhantes à *Naegleria* do líquido cefalorraquidiano de um paciente com meningoencefalite. As equipes de Campos (1977) e de Biasoli (1981) em São Paulo e Fortaleza, respectivamente, também identificaram formas trofozoíticas de AVL em líquido de pacientes com lesão cerebral. Entretanto, o primeiro caso confirmado de meningite por AVL foi descrito somente em 1983 por Carvalho *et al*, após necropsia do tecido cerebral de uma jovem que faleceu por causa não esclarecida. O agente patogênico foi identificado como *Naegleria fowleri* (BUTT *et al*, 1968).

A partir das novas descobertas, o conceito de Schaudinn (1903), tornou-se inválido, tendo em vista que *E. histolytica* não é a única ameba patogênica para o homem. Atualmente, acredita-se que outros tipos de amebas incluindo as *Acanthamoeba* podem causar patologias em seres humanos e por esta razão esse tema tem ganhado muita importância dentro da comunidade médica e científica.

2.2 Distribuição, ciclo de vida e morfologia de *Acanthamoeba*

As amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* são as amebas mais comumente isoladas em amostras ambientais e encontradas em uma variedade de habitats, sendo consideradas cosmopolitas. Sua presença em rios, lagos, água de abastecimento público e águas de piscinas, podem representar um risco pra a saúde humana, já que o contato com estas é a principal via de contágio (ARMSTRONG *et al*, 2000).

No homem, são encontradas no nariz e traquéia de pacientes com as vias respiratórias afetadas, secreções bronquiais, olhos e em amostras de pacientes com diarreia (VISVESVARA e STEHR-GREEN, 1990). Contudo, as AVL também podem ser isoladas da garganta e da mucosa nasal de indivíduos normais, o que pode levar a pensar que essas amebas formam parte da flora normal do homem. As espécies de *Acanthamoeba* não necessitam de hospedeiro para seu desenvolvimento. Sua presença no homem é completamente acidental, sendo as patologias as quais se associam frequentemente oportunistas (MARTINEZ, 1991).

Essa amebas apresentam duas formas morfológicas em seu ciclo de vida. O trofozoíto, que se alimenta e multiplica de forma ativa no meio, quando há fartura de nutrientes, sendo também a fase invasiva no hospedeiro; e o cisto ou forma de resistência, encontrado quando as condições do meio são desfavoráveis (KHAN, 2003) (**Figura 1**).

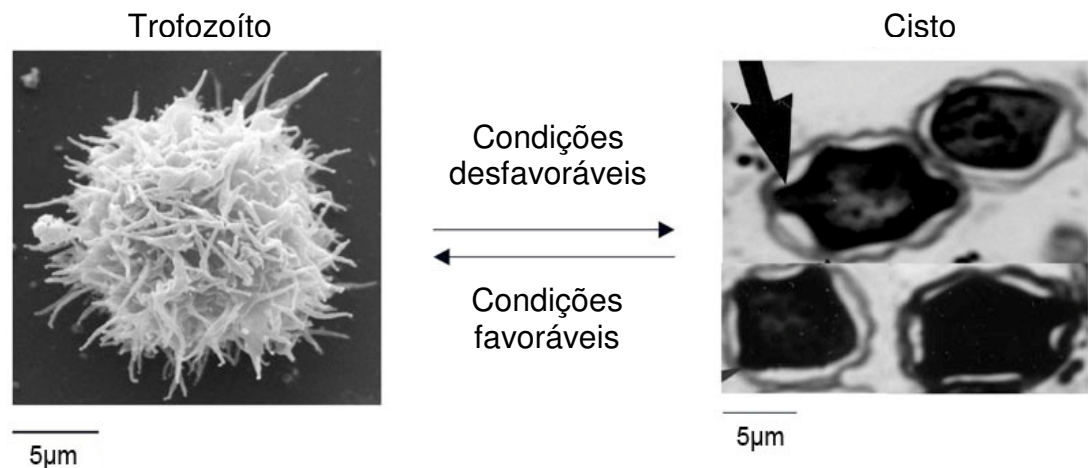


Figura 1. O ciclo de vida de *Acanthamoeba*. A forma infectante de *Acanthamoeba* conhecida como trofozoíto. Em condições adversas como a falta de alimentos, extremos de temperatura, pH e osmolaridade, ou dessecação, se diferenciam em cistos de parede dupla, como indicado pela seta. Barra = 5 micrômetros (KHAN, 2003).

Os trofozoítos de *Acanthamoeba* apresentam tamanho aproximadamente entre vinte a quarenta micrômetros, possuem pouca mobilidade, núcleo com um único nucléolo grande e proeminente, citoplasma abundante e granuloso com movimentos polidirecionais. Estes movimentos são realizados através da emissão de pseudópodos globosos e hialinos, de onde surgem numerosas projeções filiformes parecidas com espinhos, que recebem o nome de acantopódios. Ainda é evidente, a presença de vacúolos pulsáteis, citoplasmáticos e contráteis, vistos como um círculo refringente, o qual aumenta de tamanho lentamente e se fecha de forma brusca, controlando o teor de água da célula. A reprodução ocorre por divisão binária. Diferentemente do que ocorre com outras amebas de vida livre, como *Naegleria*, as espécies de *Acanthamoeba*, não apresentam formas flagelares (DE JONCKHEERE, 1991).

A alimentação é constituída de bactérias, algas e leveduras no ambiente. A ingestão dos alimentos ocorre pela emissão de pseudópodos que englobam as partículas promovendo a fagocitose. Quando esses trofozoítos são cultivados em laboratório de forma axênica (livre de outros microrganismos) em meio de cultura líquido os nutrientes são absorvidos por pinocitose (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003).

Os cistos são latentes e protegem as amebas de ambientes nocivos. Apresentam uma grande variedade de formas, porém todos eles possuem uma série de aspectos que os caracterizam: seu tamanho é ligeiramente menor que dos trofozoítos (entre quinze e vinte e oito micrometros), contêm um só núcleo (alguns excepcionalmente possuem dois), possuem uma parede composta por dois envoltórios, um externo outro interno. O envoltório mais interno adere-se muito perto ao protoplasma, formando o endocisto que pode apresentar-se poligonal, esférico ou estrelado. O envoltório externo encontra-se mais ou menos dobrado e ao redor do envoltório interno formando o ectocisto. Os dois envoltórios são separados entre si, mas se unem nos ostíolos ou orifícios de saída (PAGE, 1967; KHAN *et al*, 2006). Cada ostíolo possui um opérculo, que é arrancado no momento do desencistamento, essa abertura gerada é empregada pelos trofozoítos para abandonar seu envoltório cístico (PUSSARD e PONS, 1977).

2.3 Classificação taxonômica

Acanthamoeba foi primeiramente descrita por Castellani (1930), quando ele relatou a presença de uma ameba em culturas de *Cryptococcus pararoseus*. O gênero *Acanthamoeba* foi estabelecido, mas a classificação real de organismos dentro deste gênero está em constante revisão. A identificação é simples, pois a presença de projeções citoplasmáticas em trofozoítos denominadas de acantopódios e outras características morfológicas são típicas deste gênero (PAGE, 1967). Segundo a classificação sistemática clássica descrita por Levine *et al* (1980), o gênero *Acanthamoeba* pertence ao Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Classe Rhizopoda, Ordem Amoebida e Família Hartmannellidae. Apesar de a proposta tradicional de Levine *et al* (1980) continuar vigorando nos tempos atuais, uma nova classificação dos protozoários foi proposta pela Sociedade Internacional de Protozoologia em 2005 (ADL *et al*, 2005). De acordo com esta classificação, *Acanthamoeba* encontra-se no super grupo *Amoebozoa* e na primeira classificação

Acanthamoebidae. A proposta se baseia em ferramentas mais modernas além da análise morfológica, como análises bioquímicas e moleculares.

No entanto, usando critérios morfológicos, a identificação dessas amebas em nível de espécie é difícil. Mas foi em 1977, que Pussard e Pons propuseram a divisão do gênero *Acanthamoeba* em três grupos morfológicos com 18 espécies, e que atualmente abrigam 24 espécies diferentes (**Tabela 1**). Essa classificação está baseada no tamanho e na forma dos cistos de *Acanthamoeba*. O grupo I possui um cisto maior, medindo 18 µm ou mais, com endocisto em forma de estrela e ectocisto arredondado que pode ser liso ou rugoso. O grupo II compreende cistos menores que 18 µm com endocisto poliédrico, triangular, globular ou ovóide e ectocisto ondulado. Já no grupo III os cistos apresentam-se com tamanho menor que 19 µm, o endocisto é globular ou ovóide e o ectocisto fino e liso (PAGE, 1967; PUSSARD e PONS, 1977).

Tabela 1. Classificação das principais espécies de *Acanthamoeba* de acordo com os grupos morfológicos descritos por Pussard e Pons (1977)

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
<i>A. astronyxis</i>	<i>A. castellani</i>	<i>A. palestinensis</i>
<i>A. comandoni</i>	<i>A. mauritaniensis</i>	<i>A. culbertsoni</i>
<i>A. echinulata</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. lenticulata</i>
	<i>A. lugdunensis</i>	<i>A. pustulosa</i>
	<i>A. quina</i>	<i>A. royreba</i>
	<i>A. rhisodes</i>	
	<i>A. divionensis</i>	
	<i>A. paradivionensis</i>	
	<i>A. griffini</i>	
	<i>A. triangularis</i>	

Stothard *et al* (1998), através da análise do DNA ribossomal da subunidade 18s, estabeleceu um novo critério de identificação para *Acanthamoeba*. Os autores utilizaram a sequência do gene que codifica o RNA da subunidade menor do ribossomo para classificar 53 isolados de *Acanthamoeba*, organizando o gênero em doze tipos seqüenciais de T1 a T12. Posteriormente, mais 3 tipos seqüenciais foram

reconhecidos: T13 (HORN *et al*, 1999); T14 (GAST, 2001) e T15 (HEWETT *et al*, 2003). Considera-se ainda que muitos outros tipos sequenciais possam existir.

A classificação mais aceita, até o momento, integra os grupos morfológicos que foram estabelecidos por Pussard e Pons (1977) juntamente com os 12 tipos de sequências (STOTHARD *et al*, 1998). As amebas do grupo I encontram-se nas seções T7, T8 e T9. As do grupo II incluem as seções T3, T4, e T11 e as do grupo III nas seções T1, T2, T5, T6, T10 e T12. Estudos de isolados causadores de ceratite são pertencentes à seção do tipo T4, do grupo II, *A. castellanii*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes* e *A. triangularis* (GAST *et al*, 1996; WALOCHNIK, 2000).

2.4 Infecções por *Acanthamoeba* no ser humano

As amebas de vida livre (AVL) do gênero *Acanthamoeba* têm sido isoladas em uma ampla variedade de habitats e seu contato com o homem é um evento aparentemente comum. Desde o reconhecimento das amebas deste gênero como agentes causadores de infecções oportunistas, seu diagnóstico deve ser realizado com precisão. As patologias que podem causar no homem estão intimamente relacionadas com a via de transmissão, tecidos que são capazes de colonizar e, sobretudo, com o estado imunológico do paciente (KHAN *et al*, 2000).

O aumento do número de pessoas que necessitam de uma terapia imunossupressora, como consequência de transplantes de órgãos, o aumento de pacientes infectados com HIV, alcoolismo, abuso de drogas, tratamento com esteróides, quimioterapia e radioterapia para câncer e os portadores de outras doenças como diabetes, Lupus Eritematoso Sistêmico, insuficiência renal, cirrose, tuberculose, úlcera na pele e doença de Hodgkin, possui uma relação intrínseca com o aumento de casos relacionados à infecção por AVL (VISVESVARA *et al*, 2007; ROCHA-AZEVEDO *et al*, 2009; CHOMICZ *et al*, 2010). Apesar de a susceptibilidade às infecções estar bastante relacionada à debilidade e supressão imunológica, casos de encefalite granulomatosa amebiana têm sido encontrados em crianças e adultos imunocompetentes (SANGRUCHI *et al*, 1994; SINGHAL *et al*, 2001; LACKNER *et al*, 2010). Já os casos de infecções das córneas, parecem ser favorecidos por uma imunodepressão local (ARMSTRONG, 2000).

Contaminação de pele lesionada e epitélio do trato respiratório constituem a porta de entrada para estes protozoários. Nestes casos, a ameba pode se

disseminar pela via hematogênica para o sistema nervoso central (SNC) e para vários órgãos (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; SCHUSTER e VISVESVARA, 2004).

As doenças causadas por *Acanthamoeba* no ser humano são: encefalite amebiana granulomatosa (EAG), acantamebíase cutânea e ceratite amebiana ou ceratite por *Acanthamoeba* (CA). São infecções de curso crônico e evolução geralmente prolongada. O período de incubação é ainda desconhecido, mas são necessárias semanas ou meses para se estabelecer o período clínico da doença (JONCKHEERE, 1991; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003).

2.4.1 Úlcera Cutânea

As úlceras cutâneas produzidas por *Acanthamoeba*, geralmente, estão associadas a indivíduos imunodeprimidos, particularmente, a pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - AIDS (MURAKAWA *et al*, 1995; HUNT *et al*, 1995; DELUOL, 1996).

A presença de lesões disseminadas na pele é o ponto de partida para a manifestação da infecção por *Acanthamoeba*. As lesões representam um foco primário de infecção ou são o resultado da disseminação hematogênica de outros sítios, como o trato respiratório, ou sistema nervoso central. A taxa de mortalidade para pacientes sem envolvimento do SNC é de aproximadamente de 73%, enquanto que para aqueles que apresentam envolvimento do SNC é de 100% de mortalidade (TORNO *et al*, 2000, MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003).

O exame histológico de lesões cutâneas geralmente mostra focos de necrose cercados de células inflamatórias, vasculites e presença de trofozoítos e cistos de amebas (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Os parasitos podem ser escassos e difíceis de serem encontrados ou abundantes com numerosos cistos associados ao granuloma. O aspecto dos parasitos é semelhante ao encontrado em lesões tissulares do sistema nervoso, entretanto podem confundir-se com outros agentes infecciosos ou mesmo com macrófagos quando o examinador não está familiarizado com a ameba. O aparecimento de lesões de pele pode assemelhar-se a lesões por fungos, vírus, micobactéria, inflamação devido a um corpo estranho, leishmaniose, ou câncer de pele como sarcoma de Kaposi (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Como diagnóstico das formas cutâneas, pode ser utilizado o cultivo de amostras de lesões em meios para o crescimento de amebas, biópsia e exame

histológico. Uma suspeita clínica e um diagnóstico de certeza levam a um tratamento precoce que pode modificar o prognóstico da doença (FRIEDLAND *et al*, 1992; GORDON *et al*, 1992; SINGHAL *et al*, 2001).

2.4.2 Encefalite Granulomatosa Amebiana

A encefalite amebiana granulomatosa (EAG) é uma doença de curso clínico prolongado, com um quadro subagudo ou crônico, provocada por várias espécies de amebas do gênero *Acanthamoeba*, por uma espécie do gênero *Balamuthia*, *B. mandrillaris* e por uma espécie do gênero *Sappinia*, *S. diploidea* (MARTINEZ *et al*, 1994; MARCIANO CABRAL e CABRAL, 2003).

Os principais sintomas são: desordens no estado mental, cefaléia intensa, febre não muito elevada, rigidez da nuca, náuseas e vômitos, ataques apopléticos, e um nível diminuído de consciência. Em alguns casos, a doença evolui para o coma antes do óbito (MARTINEZ *et al*, 1994). Mais de 240 infecções de encefalite amebiana granulomatosa foram informadas na literatura a partir de 2002, sendo a maioria delas com resultados fatais (QUARNSTRON, 2006).

A patogênese da infecção envolve necrose hemorrágica grave, edema moderado a intenso com lesões multifocais, exsudato crônico inflamatório, vasculite com linfócitos perivasculares. Comumente, trofozoítos podem ser encontrados nos tecidos recobertos por células inflamatórias constituindo a forma granulomatosa típica desta infecção (MARTINEZ e VISVESVARA, 1994; VISVESVARA *et al*, 2007) (**Figura 2**).

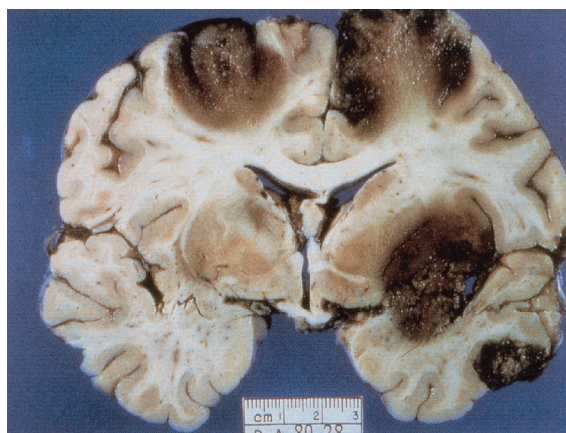


Figura 2. Secção coronal de hemisfério cerebral com necrose cortical e subcortical de caso humano de EAG fatal (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003).

O diagnóstico pode ser citopatológico, utilizando amostra de fluído cérebro espinhal (SHARMA *et al*, 1993; SINGHAL *et al*, 2001). Métodos de cultivo também podem ser utilizados no diagnóstico. Amostras biológicas como fluido cérebro espinhal e tecido cerebral, podem ser inoculadas em meio de crescimento para ameba (MARTINEZ e VISVESVARA, 1991). Ressonância magnética e tomografia computadorizada apesar de não fornecerem diagnóstico definitivo, são realizadas em alguns pacientes e ajudam a localizar e reconhecer as lesões características (MARTINEZ e VISVESVARA, 1997).

2.4.3 Ceratite por *Acanthamoeba*

A ceratite por *Acanthamoeba* ou ceratite amebiana (CA) é uma infecção invasiva da córnea, que se caracteriza por uma perda gradual da acuidade visual, chegando a alguns casos, provocar cegueira. A infecção é na maior parte dos casos unilateral (ERTABAKLAR *et al*, 2009; SARPARANTA *et al*, 2009), mas casos de ceratite amebiana bilateral por *Acanthamoeba* são descritos na literatura (KIM e KIM, 2009; LEE e GOTAY, 2010).

Esta doença ocorre com mais frequência em usuários de lentes de contato uma vez que as lentes podem atuar como veículos carreadores do patógeno. Trauma de córnea por agentes físicos que possam veicular e introduzir a ameba no tecido ocular, também pode favorecer a infecção (JONES *et al*, 1975; STAPLETON *et al*, 2009).

Condições que promovem a doença incluem a uso de soluções salinas caseiras, falta de higiene e manutenção das lentes de contato. Outro fator de risco é o uso de lentes de contato durante atividades recreativas em piscinas ou fontes naturais de água que possam albergar microbiota bacteriana e amebas patogênicas. Trauma da córnea devido a lesão por um corpo estranho e a exposição à água contaminada também pode ser associada à infecção por *Acanthamoeba* (SINGHAL *et al*, 2001; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; VISVESVARA *et al*, 2007).

Sintomas da doença incluem vermelhidão, lacrimejamento, fotofobia, e edema palpebral (**Figura 3**). Inicialmente, as amebas estão restritas ao epitélio da córnea, mas como a doença progride, elas invadem o estroma subjacente, causando danos leves até inflamações graves. Os trofozoítos podem se infiltrar na córnea causando neurite e necrose nos nervos. Em raras circunstâncias, as espécies de *Acanthamoeba* podem se espalhar a partir da córnea para a retina e em casos

graves que não respondem à terapia médica e cirúrgica, a enucleação do olho pode ser necessária (VIVESVARA e SHER-GREEN, 1990; FERNANDEZ e CRESPO, 1992; OBEID *et al*, 2003; RUTHES *et al*, 2004; VISVESVARA *et al*, 2007; ERTABAKLAR *et al*, 2009).

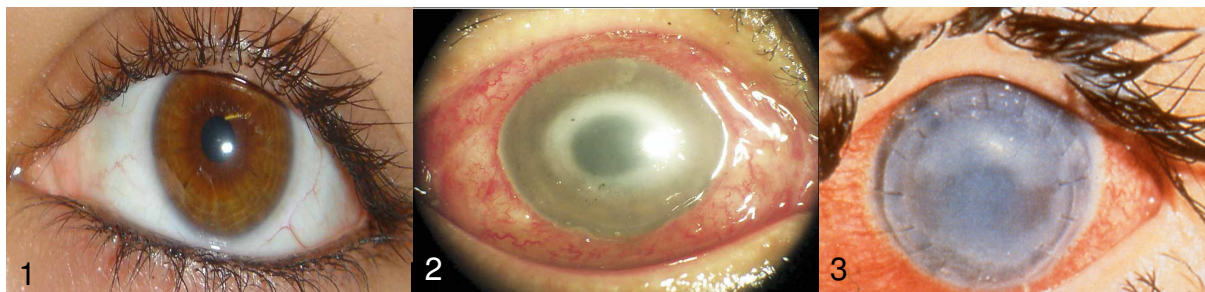


Figura 3. Ceratite amebiana. (1) Olho normal; (2) Olho com Infiltrado em anel no estroma corneal; (3) olho com infecção em estado avançado de infiltrado corneal e tecido necrosado. Fonte: Siddiqui e Khan (2012).

A ceratite por *Acanthamoeba* é freqüentemente confundida com outras ceratites infecciosas, como a ceratite herpética, o que retarda o início do tratamento específico. A comprovação laboratorial da etiologia amebiana é obtida através do raspado corneal para a realização de esfregaços e cultura. Dados adicionais podem ser obtidos através da análise de todo o material utilizado no manuseio, desinfecção e armazenamento das lentes de contato. A ceratite por *Acanthamoeba* é uma doença relativamente recente e nas últimas décadas o seu tratamento tem sido motivo de vários estudos, sendo considerada uma infecção de difícil diagnóstico e tratamento (WALOCHNIK *et al*, 2000; KHAN *et al*, 2003).

O diagnóstico precoce seguido de tratamento agressivo é essencial para o prognóstico de sucesso. Nenhum medicamento usado isoladamente demonstrou ser eficaz. O regime de tratamento inclui polihexametileno biguanida ou gluconato de clorexidina juntamente com propamidine isetionato ou hexamidina. Se existir a associação da infecção de córnea por *Acanthamoeba* juntamente com bactérias recomenda-se também o uso de antibióticos tais como neomicina ou cloranfenicol (SIDDIQUI e KHAN, 2012).

O número de casos diagnosticados de ceratite amebiana provocada por *Acanthamoeba* aumentou dramaticamente durante a última década, calcula-se que mais de 3.000 casos aconteceram somente nos Estados Unidos (QUARNSTRON, 2006). A incidência anual de ceratite por *Acanthamoeba* foi estimada em 1,36 por

milhão nos EUA (STHER-GREEN, BAILEY e VIVESVARA, 1989), em 3,06 por milhão na Holanda (MORLET *et al*, 1997) e em 1,2 por milhão no país de Gales (RADFORD *et al*, 2002). Na Inglaterra, a incidência é de 0,2 a 1 indivíduo para cada 10.000 usuários de lentes de contato por ano (RADFORD *et al*, 2002).

2.5 Mecanismos de infecção

Para que *Acanthamoeba* possa realizar efeito citopático sobre seu hospedeiro, é requerida uma série de processos prévios, tais como adesão a células ou superfícies epiteliais, secreção de proteases para desorganizar estes tecidos e, por último, fagocitose celular (**Figura 4**).

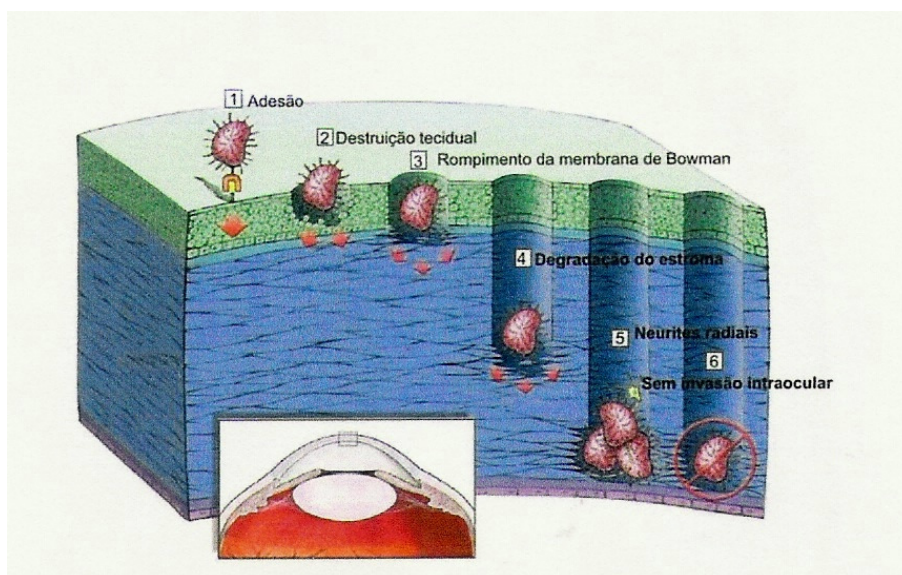


Figura 4. Patofisiologia da ceratite amebiana. (1) Adesão; (2) produção de proteinase induzida por manose; (3) rompimento da membrana de Bowman e invasão do estroma; (4) produção de protease; (5) ataque aos nervos córneos; (6) estabelecimento da infecção. Fonte: Adaptado de Clarke e Niederkorn (2006)

Yang *et al* (1997) e Khan *et al* (2001) afirmam que a adesão é um dos passos cruciais na patogenicidade da ameba; as amebas não patogênicas apresentam níveis muito baixos de união às células de seu hospedeiro. O número de acantopódios que a ameba apresenta está intimamente ligado à sua capacidade de adesão. A capacidade deste protozoário de unir-se ao epitélio celular é, por tanto, um pré-requisito para o estabelecimento da enfermidade e um fator de virulência entre as amebas que se isolam do meio e as que são isoladas de córneas infectadas (VAN KLINK *et al*, 1992; NIEDERKORN *et al*, 2007).

O mecanismo preciso do processo de adesão ainda não está bem elucidado, muitos autores acreditam que as glicoproteínas e glicolipídios de membrana da superfície celular facilitam a união dos trofozoítos de *Acanthamoeba* às células hospedeiras, o mesmo ocorre com bactérias, fungos e outros protozoários patogênicos (PANJWANI *et al*, 1992). A aderência às superfícies epiteliais acontece através de proteínas de união da manose que se apresentam na membrana superficial da ameba (YANG *et al*, 1997; IMBERT-BOUYER *et al*, 2004). Leher *et al* (1998) demonstrou, *in vitro*, que, aumentando a concentração de manose no sobrenadante em cultivo de celulares, ocorre a lise das mesmas, porque os trofozoítos são induzidos a liberar fatores citolíticos, principalmente colagenolíticos e serinoproteásicos. Entretanto, quando são empregados outros tipos de açúcares, como a lactose, este efeito não é observado. As enzimas proteolíticas possuem uma grande importância no desenvolvimento da patogenicidade de *Acanthamoeba* e, entre elas, as que apresentam maior relevância, estão associadas às fosfolipases e às neuraminases, sendo as amostras de amebas virulentas as que produzem maiores quantidades desta última enzima (PELLEGRIN *et al*, 1991; KHAN *et al*, 2003).

Existem diferentes teorias sobre os processos de invasão que os trofozoítos podem executar. Entre esses mecanismos de invasão encontram-se descritos processos de lise celular (TAYLOR *et al*, 1995) e sistemas combinados em que podem ser observados, conjuntamente, citólise com a digestão de células inteiras. Provavelmente, *Acanthamoeba* seja capaz de adaptar seu mecanismo de colonização em função da superfície celular a qual se une (LEHER *et al*, 1998).

Os trofozoítos de *Acanthamoeba* podem matar uma grande variedade de células de mamíferos, tanto normais como tumorais, empregando mecanismo de citólise. O mecanismo citolítico que *Acanthamoeba* emprega assemelha-se ao de células agressoras naturais, os linfócitos T citotóxicos (YOUNG *et al*, 1982). Ocorre a formação de poros na membrana da célula, alterando a pressão osmótica da mesma, induzindo a sua desorganização iônica e com isto, a morte (BERKE, 1991; KRAHENBUHL e TSCHOPP, 1991). A citólise ou morte celular cálcio-dependente é favorecida quando se ativam esses canais, e ocorre inibição, quando estes são bloqueados (TAYLOR *et al*, 1995). Os trofozoítos de *Acanthamoeba* são também capazes de induzir apoptose. Células normais ou tumorais de mamíferos, expostas a trofozoítos ou extratos aquosos destes, apresentaram aspectos morfológicos

característicos de estado de apoptose, como flacidez celular, desorganização da membrana, formação de corpos apoptóticos, condensação nuclear e presença de DNA fragmentado, em torno de 180 a 200 pares de bases, agrupados em multímeros (ALIZADEH *et al*, 1994).

Estudos *in vitro* demonstraram que os trofozoítos apresentam potentes repostas quimiotáticas em extratos de células neuronais e células originárias da crista neural (PIDHERNEY *et al*, 1993) provocando a citólise direta ou apoptose de células nervosas (PETTIT *et al*, 1996).

2.6 Resposta imune

As amebas do gênero *Acanthamoeba* são protozoários bastante comuns no meio ambiente e estão em constante contato com o homem (CURSONS *et al*, 1980; CERVA, 1989; NIEDEKORN *et al*, 1999).

Os mecanismos de defesa que o organismo humano emprega estão relacionados com os processos de citólise e ativação celular, tanto de macrófagos, como de neutrófilos, mediados pelo Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). O interferon gamma (IFN- γ) é favorecido pela presença de anticorpos específicos (BERKE *et al*, 1991; VAN KLINK *et al*, 1996).

O papel exato dos neutrófilos, durante o desenvolvimento da resposta imune, não é bem conhecido, contudo são encontrados em número elevado, em úlceras cutâneas e em córneas de pacientes com ceratite. Acredita-se que sua atividade seja influenciada pela presença do TNF- α (FERRANTE, 1991). Isto mostra que desempenham um importante papel na erradicação da *Acanthamoeba* nas infecções de córnea, já que a diminuição de neutrófilos na córnea, em animais de laboratório, leva ao aparecimento mais precoce da patologia e uma infecção muito mais grave, enquanto que seu aumento provoca uma rápida melhora (HURT *et al*, 2001).

Experimentos *in vitro* mostram que os anticorpos específicos são capazes de ativar o mecanismo lítico do complemento, porém tem se observado que mesmo quando esses anticorpos não estão presentes, os trofozoítos de *Acanthamoeba* são capazes de ativar o mecanismo da cascata do complemento. Isto é possível, por causa da presença de proteínas reguladoras do complemento, como a CD55, na composição da lágrima e do epitélio corneal, que protegem o tecido dos trofozoítos de *Acanthamoeba* (FERRANTE e ROWN-KELLY, 1983; TONEY e MARCIANO-CABRAL, 1998).

2.7 Técnicas de identificação molecular de isolados de *Acanthamoeba*

A identificação de espécies de *Acanthamoeba*, empregando unicamente critérios morfológicos, é uma tarefa subjetiva. As características morfológicas dos cistos são influenciadas pelas condições do meio ambiente. Controlando as condições de cultivo e do processo de encistamento, observa-se que diferentes espécies apresentam características similares em seus cistos e que, em cultivos monoclonais, aparecem cistos de diversas morfologias (STRAFORD e GRIFFITHS, 1978; VISVEVARA, 1991).

As técnicas moleculares para identificação de AVL têm sido desenvolvidas para auxiliar no diagnóstico de infecções humanas. Contudo, através da inspeção da sequência do genoma não é possível obter informação sobre o nível de expressão gênica, ou sobre características das proteínas expressas. Nesse sentido, a análise proteômica é uma metodologia importante para a identificação de componentes que são essenciais para uma ação biológica efetiva. O proteoma é definido como uma complementação do estudo genômico, pois abrange o estudo de proteínas que são expressas em um organismo em uma determinada condição, incluindo suas modificações e isoformas (O'FARREL, 1975).

Numa das abordagens mais comuns em proteômica, recorre-se à separação das proteínas presentes em amostras biológicas, por eletroforese em gel de poliacrilamida. Depois da separação podem se comparar as diversas proteínas presentes no material de interesse. As técnicas de *Western Blotting* e imunodeteção de proteínas também são metodologias utilizadas para caracterização e comparação de perfil protéico. Estes métodos consistem na identificação de uma determinada proteína baseada no reconhecimento por anticorpos específicos (O'FARREL, 1975; BLACKSTOCK e WEIR, 1999; RAPPSILBER e MANN, 2002).

Ainda no sentido de melhor caracterizar molecularmente determinadas moléculas, anticorpos policlonais e monoclonais foram e vêm sendo produzidos. Walochnick *et al* (2004), utilizando anticorpos policlonais verificaram que é possível correlacionar potencial patogênico com perfil antigênico de isolados de *Acanthamoeba*. Um ano depois, o grupo de pesquisa de Willians *et al* (2005) demonstrou que diferentes anticorpos monoclonais foram capazes de evidenciar diferenças nos padrões de reatividade com diferentes espécies e cepas de *Acanthamoeba*. Assim, a produção e caracterização de anticorpos policlonais

específicos para antígenos de *Acanthamoeba* podem fornecer informações importantes sobre determinantes antigênicos, marcadores de imunogenicidade e ainda sugerir possíveis candidatos a ferramentas para a produção de testes de diagnósticos imunológicos.

Essa evolução na abordagem experimental da proteômica tem resultado do desenvolvimento, integração e automatização de uma variedade de técnicas e equipamentos que permitem separar, identificar, quantificar e caracterizar proteínas, bem como relacionar essa informação com a obtida por outras abordagens.

No caso das amebas do gênero *Acanthamoeba* é interessante verificar as diferenças entre os perfis protéicos de suas linhagens tendo em vista que são organismos de vida livre que podem tornar-se patogênicos ao ser humano (FREDERICK *et al*, 2004).

Os fatores que vão determinar se uma espécie ou linhagem será um organismo inofensivo ou potencialmente patogênico ainda não foram totalmente elucidados. Parâmetros *in vitro* e *in vivo* têm sido propostos visando identificar o potencial patogênico de amostras de *Acanthamoeba*, incluindo ensaios de tolerância a temperaturas próximas ao do corpo humano, efeito citopático e citotóxico sobre linhagens celulares e capacidade de infecção em animais de experimentação (FREDERICK *et al*, 2004). A avaliação da expressão protéica e estudo antigênico destes protozoários fornecem uma perspectiva promissora na sua diferenciação (GARATE *et al*, 2004; WALOCHNIK *et al*, 2004; TURNER *et al*, 2005). As análises de propriedades bioquímicas e imunológicas das proteínas podem fornecer informações importantes sobre possíveis marcadores de patogenicidade, além de permitirem a caracterização de antígenos estágio-específico, o que é relevante considerando que o ciclo da *Acanthamoeba* envolve duas formas evolutivas (cisto e trofozoíto). Adicionalmente, tais estudos trazem a possibilidade de uso destes marcadores para a confecção de kits de diagnóstico para infecções por *Acanthamoeba*.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar comparativamente, por meio de critérios fisiológicos, morfológicos e imunoquímicos, amostras clínicas e ambientais de *Acanthamoeba*.

3.2 Específicos

Caracterização comparativa de amostras clínicas e ambientais de *Acanthamoeba* por critério fisiológico através da cinética de crescimento e de encistamento e morfológico através da microscopia eletrônica de varredura;

Obtenção e quantificação de antígenos solúveis de trofozoítos de isolados de *Acanthamoeba* de amostras clínicas e ambientais;

Caracterização bioquímica das proteínas por meio de eletroforese;

Produção de anticorpos monoclonais e policlonais, a partir da imunização de camundongos com os antígenos solúveis;

Caracterização dos anticorpos por ELISA, *Western Blotting*, e imunofluorescência.

4. METODOLOGIA

4.1 Descrição das amostras de *Acanthamoeba*

Dois isolados utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Cinthia Furst Leroy Gomes da Universidade Federal do Espírito Santo. Um isolado de raspado de córnea de paciente com ceratite e o outro foi obtido da poeira da residência deste mesmo paciente (**Tabela 2**).

Outras duas culturas de ameba (*Acanthamoeba poliphaga*) foram incluídas, para fins de comparação nos ensaios fisiológicos, morfológicos e imunoquímicos. Essas culturas foram cedidas pelo pesquisador Dr. Fernando Costa e Silva-Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, referente às cepas do *American Type Culture Collection* ATCC # 30461 (isolado clínico de lesão de ceratite amebiana) e ATCC # 30872 (isolado ambiental obtido de água fresca), aqui denominados AP2 e AP4, respectivamente (**Tabela 2**).

As amostras clínicas e ambientais de *Acanthamoeba* foram mantidas em meio para cultivo axênico PYG (proteose – peptona extrato de levedo) suplementado com 10% soro bovino fetal (ROWBOTHAM, 1980).

Tabela 2: Isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba*.

ISOLADO	ORIGEM	DATA DE ISOLAMENTO	HISTÓRICO
AR	Clínica Vitória, ES	05/2007	CA* associada ao uso de lente de contato, raspado de córnea humana
AR11	Ambiental Vitória, ES	07/2007	Poeira - grade posterior da geladeira, na cozinha da residência do paciente do qual se obteve o isolado AR
AP2	ATCC30461	1973	CA* associada ao uso de lente de contato, raspado de córnea humana
AP4	ATCC30872	1965	Ambiental – água fresca

* CA = Ceratite amebiana

4.2 Análises fisiológicas e morfológicas de *Acanthamoeba*

Os critérios estabelecidos por Pussard e Pons (1977) e Page (1967), como a medida do tamanho dos cistos, formato e características de endocisto e ectocisto, são utilizados para estabelecer a classificação de isolados de *Acanthamoeba*, nos grupos morfológicos clássicos. No entanto essa classificação não é capaz de inferir potencial patogênico aos isolados. Nesse sentido outros estudos precisam ser realizados na tentativa de estabelecer características que possam auxiliar essa classificação. Neste trabalho foram avaliadas características que possam servir como indicadores de potencial patogênico dos isolados tais como análises fisiológicas através da cinética de crescimento e de encistamento e morfológicas através da microscopia eletrônica de varredura.

4.2.1 Curva de crescimento de trofozoítos

Os trofozoítos em fase exponencial de crescimento foram contados em câmara de Neubauer, tendo a sua concentração ajustada de modo a obter $2,5 \times 10^6$ trofozoítos/mL de água destilada esterilizada. Cem microlitros desta suspensão ($2,5 \times 10^5$ trofozoítos) foram inoculados em tubos contendo 2,5 mL de meio PYG com soro bovino fetal a 10% (inóculo inicial de 1×10^5 trofozoítos/mL de meio de cultivo). Os tubos foram incubados em estufa, na temperatura de 28°C, em posição inclinada, com três repetições para cada amostra. A cada 12 horas, para avaliar o crescimento ou a diminuição do número de células, realizava-se a contagem dos trofozoítos em câmara de Neubauer, sendo expressa em número de trofozoítos/mL de meio de cultivo. A partir destes dados foi avaliada a taxa ou velocidade média de crescimento, calculada pela fórmula $(\log NT - \log N_0) / 0,301 \times T$, onde NT refere-se a densidade máxima de trofozoítos, N_0 é o número de trofozoitos do inóculo inicial e T significa o tempo em que foi atingida a densidade máxima.

4.2.2 Velocidade de encistamento

Os trofozoítos em fase exponencial de crescimento foram contados em câmara de Neubauer, tendo a sua concentração ajustada de modo a obter $2,5 \times 10^6$ trofozoítos/mL em água destilada esterilizada. Cem microlitros desta suspensão ($2,5 \times 10^5$ trofozoítos) foram inoculados em tubos contendo 2,5 mL meio de encistamento de Neff (NEFF e NEFF, 1969). Os tubos foram incubados em estufa, na temperatura de 28°C, em posição inclinada, com três repetições para cada amostra. A cada 24

horas, para avaliar as conversões morfológicas de trofozoítos para cistos, realizava-se a contagem dos cistos em câmara de Neubauer, sendo expressa em número de cistos/mL de meio de cultivo.

4.2.3 Análise morfológica dos trofozoítos através da Microscopia Eletrônica de Varredura

O cultivo de trofozoítos foi realizado em garrafas de cultivo de 25 cm³ contendo 10 mL de meio PYG, a 30°C. Para este ensaio os trofozoítos foram cultivados durante 42 horas, e colhidos em tubos de 15 mL por centrifugação. Foram então adicionados a placas de cultivo celular de 24 poços, com uma lamínula em cada poço, contendo meio PYG, a uma densidade celular de 10⁶ trofozoítos/mL. O experimento foi realizado em triplicata para cada amostra. Após 24 horas de incubação foi retirado o meio de cultura e adicionou-se 1 mL/poço de PBS, pH 7,4 para lavagem do material. Realizada a lavagem, as lamínulas foram fixadas com uma solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 2 horas em temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos com o mesmo tampão, foi adicionado o pós-fixador tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. O material foi desidratado com adições sucessivas de etanol em concentrações diferentes, iniciando em etanol 50%, 70%, 90% e, por fim, 100%, de 10 a 20 minutos, a temperatura ambiente. Com o material seco, realizou-se o ponto crítico em CO₂ líquido através do aparelho Samdri 780 (Tousimis Research Corp.), e metalização através de um dispositivo de íon-pulverização catódica, de uma fina camada de ouro (Jeol-JFC I 100). O material foi observado por Microscopia Eletrônica de Varredura (Zeiss DSM-982 Gemini).

Além de parâmetros fisiológicos e morfológicos, características imunoquímicas também foram avaliadas na tentativa de estabelecer diferenças e/ou semelhanças de potencial patogênico. Para isso foi necessário à produção dos antígenos de *Acanthamoeba*.

4.4 Obtenção dos antígenos solúveis

4.4.1 Obtenção do antígeno bruto de trofozoítos de *Acanthamoeba*

O cultivo de trofozoítos foi realizado em garrafas de cultivo de 25 cm³ contendo 10 mL de meio PYG. Os repiques foram efetuados com inóculo inicial de 10⁵ trofozoítos/mL.

As culturas em fase exponencial de crescimento foram transferidas para tubos de centrifugação de 15 mL. Os trofozoítos foram lavados com água destilada e recuperados por centrifugação a 400 x *g* durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os trofozoítos foram suspensos em 1 mL de água destilada, para quantificação em câmara de Neubauer e posterior sonicação.

4.4.2 Sonicação

Dez pulsos 40 (voltz) de 1 minuto com intervalos de 30 segundos foram aplicados nos trofozoítos de *Acanthamoeba*. Ao final de cada procedimento de sonicação foi realizada verificação microscópica do material para confirmar se houve o rompimento das células.

4.5 Quantificação dos antígenos solúveis

4.5.1 Dosagem de proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Lowry *et al* (1951). A um volume de 0,01 mL de amostra foi adicionado 0,3 mL de uma solução cúprica alcalina, preparada no momento do uso, a qual é composta por 5 mL de solução carbonato de sódio 10% (p/v) em hidróxido de sódio 0,5 M, adicionada de 0,25 mL de sulfato cúprico 1% (p/v) e 0,25 mL de tartarato de sódio e potássio 2% (p/v). A mistura foi agitada e colocada em repouso durante 10 minutos. Em seguida foi adicionado 0,9 mL do reagente Folin-Ciocalteu (Merck), previamente diluído 1:11 (v/v) em água, sendo imediatamente agitado. Após 10 minutos em banho maria, a 50°C, a absorbância foi medida a 660 nm em espectrofotômetro.

A concentração proteica foi determinada utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (Sigma), com amplitude de 0-250 µg pela determinação da absorbância em espectrofotômetro.

4.6 Caracterização Imunoquímica

Para que fosse possível a caracterização dos antígenos solúveis dos isolados aqui estudados o perfil de proteínas foi analisado pela técnica de eletroforese. Também foram produzidos anticorpos policlonais e monoclonais contra esses antígenos.

A técnica *Western Blotting* foi utilizada para a caracterização do perfil da reatividade dos anticorpos produzidos frente aos antígenos de *Acanthamoeba*, assim como o estudo da reatividade cruzada entre eles.

4.6.1 Produção de anticorpos policlonais

Todos os procedimentos realizados com os camundongos foram aprovados pelo Comitê de Ética sobre experimentação com animais da Universidade Federal do Paraná (n° do certificado 23075.087228/2009-74) de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados 20 camundongos (fêmeas, SWISS/UNIVALI) divididos em 5 grupos com 4 camundongos cada. Os grupos foram subdivididos da seguinte maneira: O grupo 1 recebeu injeções de antígenos bruto de AP4 (isolado ambiental), grupo 2 recebeu injeções de AP2 (clínico), o grupo 3 foi imunizado com antígeno AR (isolado clínico), o grupo 4 com AR 11 (isolado ambiental) e o último grupo recebeu injeções que continham somente tampão PBS e adjuvante, como controle negativo.

Cada camundongo recebeu uma dose inicial de 200 µL, contendo 30 µg de antígeno, via subcutânea, homogeneizado em adjuvante completo de Freund.

Após duas semanas, cada um dos camundongos recebeu nova injeção subcutânea conforme descrito acima, porém com adjuvante incompleto de Freund. Após dez dias, testou-se a reatividade do soro destes animais por ELISA.

Três injeções posteriores foram administradas, em intervalos de 20 dias, com 30 µg de cada antígeno, cada uma, por via subcutânea, emulsificadas em adjuvante incompleto de Freund. Uma semana após a última injeção, foi realizada a sangria total dos animais para obtenção do soro imune. O título de anticorpos foi avaliado por ELISA. A escolha do adjuvante e do esquema de imunização foi feita com base

nos resultados obtidos na literatura com respeito à produção de anticorpos anti-*Acanthamoeba* (WALOCHNIC *et al*, 2004).

4.6.2 Produção de anticorpos monoclonais

Dois camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com o antígeno bruto do isolado AR (amostra de paciente com ceratite), seguindo mesmo protocolo descrito no item anterior. Terminado o esquema de imunização, o animal que apresentou melhor título de anticorpos, demonstrado por ELISA, recebeu uma última dose via endovenosa com 5 µg de antígeno (AR) diluído em 100 µL de PBS.

Obtenção do hibridoma

Células sp2/0 foram descongeladas e mantidas em estufa de 37°C em atmosfera de CO₂ de 5%, em meio DMEM 10 (Dulbecco's Modified EAGLES Medium suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µmol/L de L-glutamina, 100 UI penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) de forma a se obter um número de células ideal para a fusão (1×10^7 células/mL).

Três dias após a última imunização os camundongos foram sangrados. O camundongo com maior título no ELISA foi submetido a eutanásia e seu baço removido assepticamente. O tecido foi transferido para uma placa de Petri estéril contendo 5 mL de meio DMEM e cortado em pequenos fragmentos que foram macerados sobre uma tela de malha fina esterilizada. O material foi passado por uma segunda tela e lavado três vezes com DMEM utilizando-se uma centrífuga refrigerada a 1000 xg por 10 minutos.

As células de mieloma, repicadas 24 horas antes, foram lavadas conforme descrito anteriormente, diluídas a 1×10^7 /mL, misturadas a todas as células obtidas com a maceração do baço e centrifugadas a 1000 xg e 4°C por 10 minutos. Ao sedimento adicionou-se, lentamente, 1 mL de uma solução de polietilenoglicol (PEG) 1500 a 50% (p/v) em DMEM pré-aquecido à 37°C, agitando-se lentamente o tubo por alguns minutos. Após 1 minuto de repouso foram adicionados 20 mL de DMEM divididos em quatro intervalos de 5 minutos agitando-se lentamente. As células foram centrifugadas a 4°C, 800 xg por 10 minutos e ao precipitado foram adicionados 100 mL de meio seletivo HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) e DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino. A suspensão final foi distribuída em placas de 96 poços (200 µL/poço) que foram levadas à estufa à 37°C e atmosfera de CO₂ a 5%.

Quinze dias após a obtenção dos hibridomas, o sobrenadante dos poços foi testado em ELISA utilizando-se 50 µg/mL de antígeno de *Acanthamoeba* sendo a reatividade verificada com a incubação de imunoglobulinas heterólogas anti IgG murino conjugados com a enzima peroxidase.

Seleção e clonagem dos hibridomas

As placas para a clonagem foram previamente preparadas com 100 µL de meio DMEM. Após contagem das células, a solução de origem foi diluída em meio HT-DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino de forma a se ter uma única célula em cada um dos poços previamente preparados.

Após a segunda clonagem, uma nova seleção por ELISA foi realizada utilizando-se antígenos solúveis do isolado clínico AR em concentração de 50 µg/mL. Foram selecionados 10 clones positivos os quais foram amplificados e testados.

Um hibridoma foi selecionado para ser purificado por coluna de afinidade sepharose proteína G e proteína A. O isotipo do anticorpo monoclonal purificado foi determinada pelo Kit de isotipagem “IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody” (Roche Diagnostics Corporation, Alameda, CA, USA) conforme instruções do fabricante.

4.6.3 Eletroforese

Um gel em concentração de 10% de acrilamida (LAEMMLI, 1970) foi preparado para a migração dos antígenos de *Acanthamoeba* em presença de 10% dodecil sulfato de sódio (SDS) em sistema BioRad. Utilizou-se 10 µg por canaleta de cada antígeno. Estas amostras foram adicionadas ao tampão de amostra em condições não redutoras [tris-HCl 0,5 mol/L, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 10% (p/v) e azul de bromofenol 0,1% (p/v)] ou em condições redutoras [tris-HCl 0,5 mol/L, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 10% (p/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v) e agente redutor b-mercaptoetanol 5% (v/v)] e fervidas por 3 minutos.

A migração aconteceu utilizando-se tampão de migração (Tris 0,025 mol/l, glicina 0,2 mol/L e SDS 0,5%, pH 8.3) sob voltagem de 150 V.

O gel foi cortado em duas partes, uma parte foi colocada em solução fixadora [ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v)] e posteriormente foi realizada a coloração por prata para visualização das bandas proteicas; a outra parte foi utilizada na eletrotransferência das proteínas para membrana de nitrocelulose.

4.6.4 ELISA para titulação de anticorpos

Placas Falcon de 96 poços foram preparadas através da imobilização com 100 µL de uma solução de 10 µg/mL dos antígenos, para os anticorpos policlonais e 50 µg/mL para os anticorpos monoclonais em tampão carbonato (NaHCO_3 100 mmol/L, pH 9,6) durante 12-16 horas a 4°C.

Após a etapa de imobilização do antígeno, a placa foi lavada 3 vezes com solução de lavagem (0,05% tween-salina) e bloqueadas com a solução de bloqueio (caseína a 2%, diluída em PBS), por 2 horas à 37 °C.

Depois de retirada do bloqueio, a placa foi novamente lavada conforme descrito acima e incubada com pool de soros de animais imunizados diluídos em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína, 0,05% tween 20) para testar a reatividade dos anticorpos policlonais ou sobrenadante celular para testar a reatividade dos anticorpos monoclonais.

O segundo anticorpo adicionado na placa consistiu de imunoglobulinas heterólogas anti IgG murino conjugadas com a enzima peroxidase (Sigma), diluído 1:4000 em tampão de incubação. A atividade enzimática foi revelada usando-se a solução ortofenilenodiamino (OPD); após 15 minutos de incubação a reação foi interrompida pela adição de 20 µL de ácido sulfúrico diluído 1:20 (v/v). As leituras da absorbância foram feitas a 492 nm.

4.6.5 Western Blotting

As proteínas do gel foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose de 0,22 µm em sistema “BioRad Mini-Protean II cell” corrente de 24 V durante 16 horas e, posteriormente, por mais uma hora a 48 V em tampão de transferência a um pH 8,3 contendo glicina 0,2 mol/L, Tris 0,025 mol/L e metanol 20% v/v.

Após a eletrotransferência, a presença das proteínas foi certificada mergulhando-se a membrana de nitrocelulose em solução de Ponceau 0,2% e 10% de ácido acético.

Após visualização das bandas, a membrana foi lavada em tampão PBS-Tween (PBS-T) 0,05% por três vezes de 5 minutos e, posteriormente, bloqueada com tampão PBS-T 0,3% mais caseína 2%, por 1 hora, sob agitação e à temperatura ambiente.

Após o bloqueio, a membrana foi lavada por três vezes e, em seguida foram acrescentados os anticorpos primários (policlonais ou monoclonais) anti-antígenos

de *Acanthamoeba* diluídos em PBS-T 0,05%. As membranas foram incubadas a temperatura ambiente por 2 horas.

Após três lavagens com PBS-T 0,05%, as membranas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e, sob agitação, com imunoglobulinas heterólogas anti IgG murino conjugadas com a enzima peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5000, sob agitação suave e constante.

Após quatro lavagens, sendo as duas primeiras com PBS-T 0,05% e as duas últimas com PBS, a presença da peroxidase foi revelada com uma solução de PBS contendo 0,025% de 4-cloro1-naftol diluído em 1 mL de metanol, 0,05% de diaminobenzidina (DAB) em presença de H₂O₂ a 0,04% (v/v).

4.6.6 Imunofluorescência

O cultivo de trofozoítos foi realizado em garrafas de cultivo de 25 cm³ contendo 10 mL de meio PYG, a 30°C. Para este ensaio as amebas foram cultivadas durante 42h, e recuperadas em tubos de 15 mL por centrifugação. Os trofozoítos foram adicionados a placas de cultivo celular de 24 poços, com uma lamínula em cada poço, contendo meio PYG, a uma densidade celular de 10⁶ trofozoítos/mL. O experimento foi realizado em duplicata para cada amostra deste trabalho. Após 24h de incubação foi retirado o meio de cultura e adicionou-se 1 mL/poço de PBS pH 7,4 para lavagem do material. Realizada a lavagem, as lamínulas foram fixadas com uma solução de paraformaldeído 4% em PBS pH 7,4, por 20 minutos em temperatura ambiente. Após três lavagens de 5 minutos com PBS pH 7,4, foi adicionado glicina 0, 1M incubada durante 2 minutos para bloquear os radicais aldeídos. Novamente três lavagens de 5 minutos em PBS pH 7,4. Para bloquear os sítios inespecíficos foi utilizada uma solução de caseína 2% em PBS pH 7,4. Após três lavagens de 5 minutos com PBS pH 7,4, foi adicionado o anticorpo primário incubado por 2 horas (anticorpos policlonais ou monoclonais). O material foi novamente lavado com PBS pH 7,4. As lamínulas foram então incubadas durante 1h com o anticorpo secundário conjugado à fluoresceína isothiocyanato (FITC). Para promover a marcação nuclear foi adicionado 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 10 µL diluído em PBS pH 7,4 por 5 minutos. As lamínulas foram lavadas e as lâminas montadas para visualização em microscópio confocal.

4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SigmaStat para Windows versão 3.5 (Systat software Inc., Erkrath, Germany). Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste *t* de student ou Mann-Whitney. O teste ANOVA foi utilizado para comparações múltiplas entre os grupos. $P < 0,05$ foi considerado como sendo significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Perfil de crescimento em meio PYG

O perfil de crescimento das amebas foi avaliado por incubação dos isolados em meio PYG. Os dois isolados clínicos (AP2 e AR) e os dois isolados ambientais (AP4 e AR11) apresentaram como característica de crescimento a proliferação com predomínio das formas amebóides (trofozoítos) de 24 a 72 horas após cada repique. A **Figura 5** mostra que os isolados possuem padrões de crescimento diferenciados.

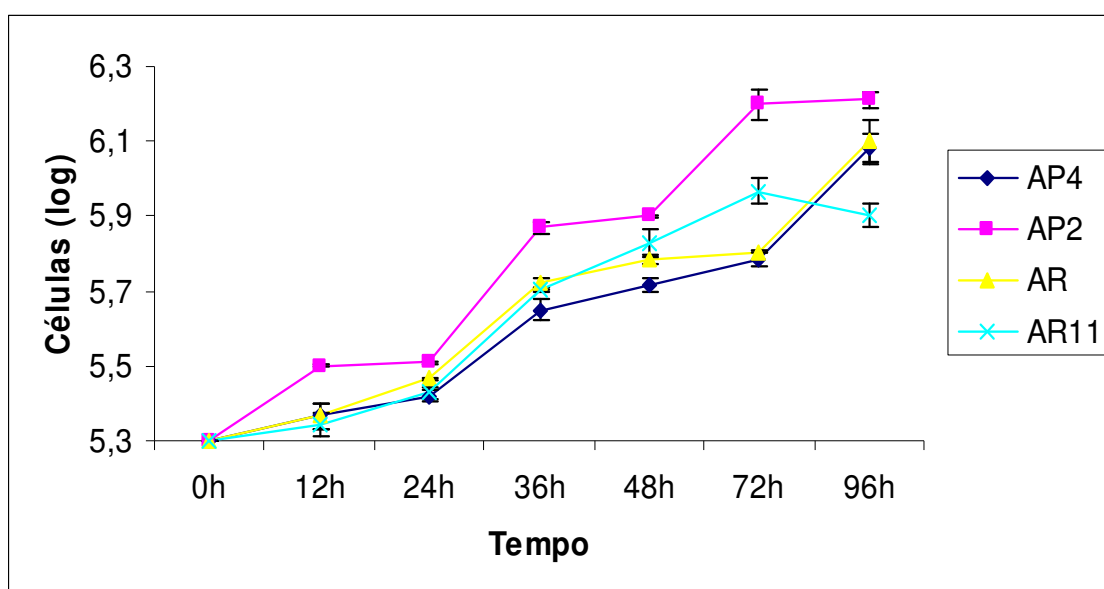


Figura 5. Cinética de crescimento. Curva de crescimento comparando densidade total amebiana. Amebas dos quatro isolados foram adicionadas a uma densidade de 10^5 trofozoítos/mL, em meio PYG. As amebas foram coletadas e quantificadas usando uma câmara de Neubauer. Foi verificada diferença significativa na cinética de crescimento entre todos os isolados para todos os tempos analisados ($P < 0,05$).

Avaliando as taxas de crescimento e os tempos de geração dos quatro isolados uma taxa de crescimento mais rápida foi observada para o isolado clínico AP2 quando comparada aos outros três isolados. O mesmo resultado pode ser observado para o tempo de geração (**Tabela 3**).

Tabela 3. Taxa média de crescimento de culturas de *Acanthamoeba* com inóculo de 10^5 trofozoítos por mL.

Cultura	Origem	Taxa de crescimento (gerações/h) ^a	Tempo de geração (horas) ^b
AP2	Ceratite - ATCC	0,031	32
AR	Ceratite	0,028	36
AP4	Água - ATCC	0,027	37
AR11	Poeira doméstica	0,027	37

- a. Calculada pela fórmula $k = (\log NT - \log N_0) / 0,301 \times T$, onde k= taxa de crescimento NT = densidade máxima de trofozoítos, N0 é o número de trofozoítos do inóculo inicial e T é o tempo em que foi atingida a densidade máxima.
- b. Calculado pela fórmula $g = 1/k$, onde g= tempo de geração e k= taxa de crescimento.

Apesar dessas diferenças entre os isolados, pode-se verificar que o tempo de geração médio para os quatro é de 36 horas. Além disso, amostras clínicas apresentam resultados que se aproximam entre si e o mesmo acontece entre os isolados ambientais. Sabendo-se dessas evidências foi feita uma análise nas primeiras horas da curva de crescimento, sendo que as amostras foram subdivididas em dois grupos, A (ambientais) e C (clínicas). Em A foram agrupadas as amostras AP4 e AR11 e em C as amostras AP2 e AR. Foi visto que o grupo das amostras clínicas apresentou crescimento mais rápido nas primeiras horas de incubação em meio de cultura quando comparado ao grupo dos isolados ambientais (**Figura 6**).

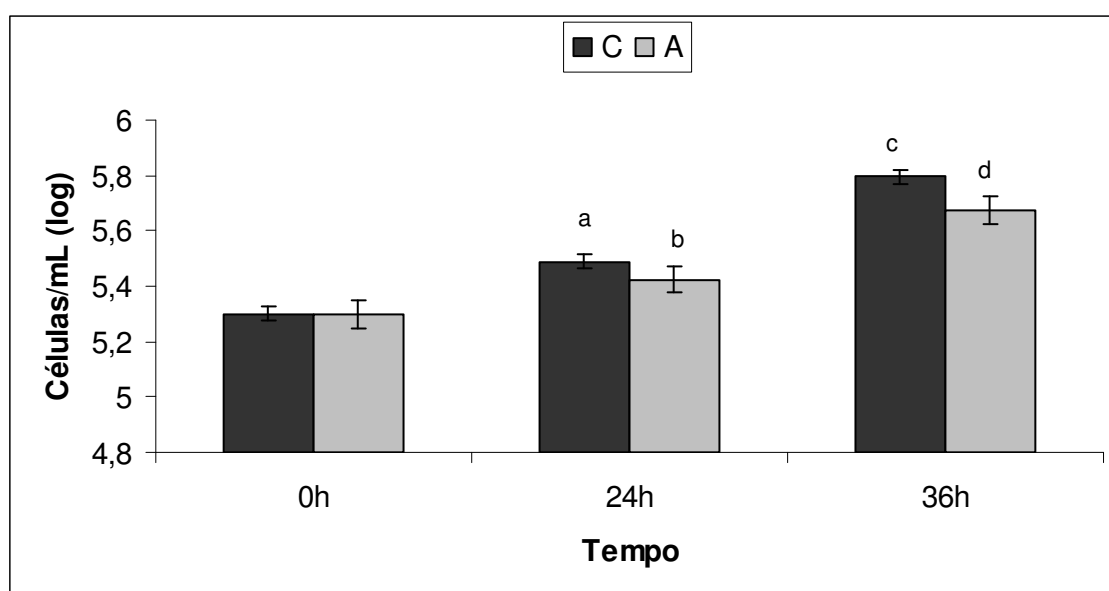


Figura 6. Comparação do padrão de crescimento das amostras clínicas e ambientais. Curva de crescimento entre os grupos A x C nos tempos 0, 24 e 36 horas. $P < 0,05$ (teste *t*). Onde A = AP4 e AR11 e C = AP2 e A11. (a. b. c. d) Houve diferença significativa entre os grupos analisados ($P < 0,05$).

5.2 Velocidade de encistamento

A capacidade de transformação fenotípica de trofozoítos para cistos é uma característica do gênero de *Acanthamoeba*, porém a velocidade com que isso acontece pode variar de isolado para isolado. Para avaliar essa característica os trofozoítos dos quatro isolados foram transferidos do meio de cultura rico em nutrientes (PYG) para um meio de encistamento onde há ausência de nutrientes (Neff).

A cinética de encistamento, representada na **Figura 7**, mostrou que os trofozoítos incubados em meio de encistamento Neff transformaram-se em cistos, mas a velocidade variou entre os quatro isolados. Os isolados ambientais AP4 e AR11 apresentaram maior agilidade de encistamento quando comparado aos isolados clínicos AP2 e AR. Após incubação de 72 horas em meio de encistamento Neff, o número de células encistadas atingiu cerca de 98% do número total de células para todos os isolados (**Figura 7**).

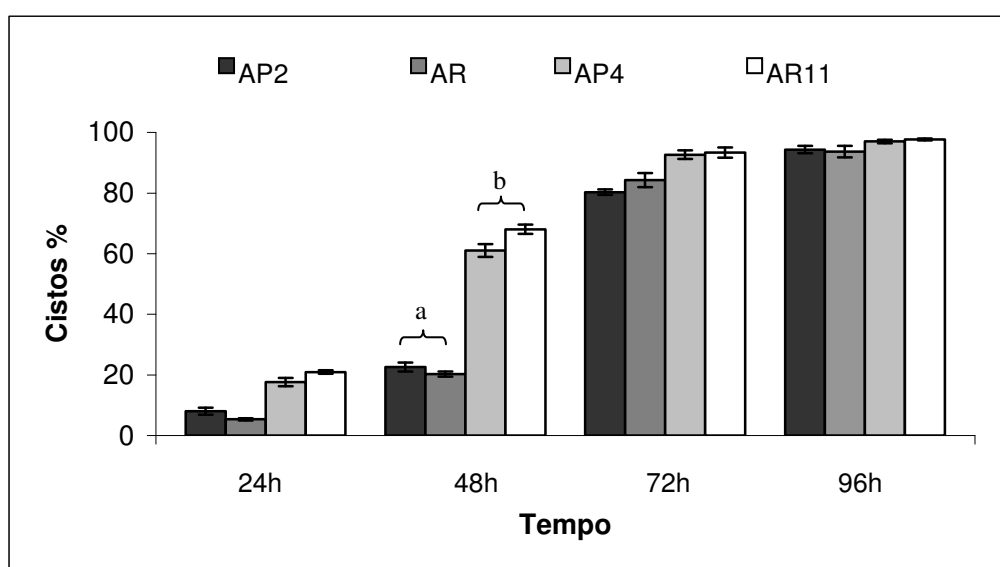


Figura 7. Cinética de formação de cistos de *Acanthamoeba* em meio Neff, das amostras de referência AP4 (ambiental) e AP2 (clínico) e dos isolados AR (clínico) e AR11 (ambiental). (a. b) Houve diferença significativa entre os grupos analisados ($P < 0,05$).

5.3 Morfologia de trofozoítos de *Acanthamoeba* observada por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Os trofozoítos de *Acanthamoeba* são caracterizados por uma forma amebóide com presença de projeções citoplasmáticas chamadas de acantopódios. Através da MEV foi possível visualizar essas projeções. Como pode se observar na **Figura 8**, existe uma variação na quantidade de acantopódios entre os isolados.

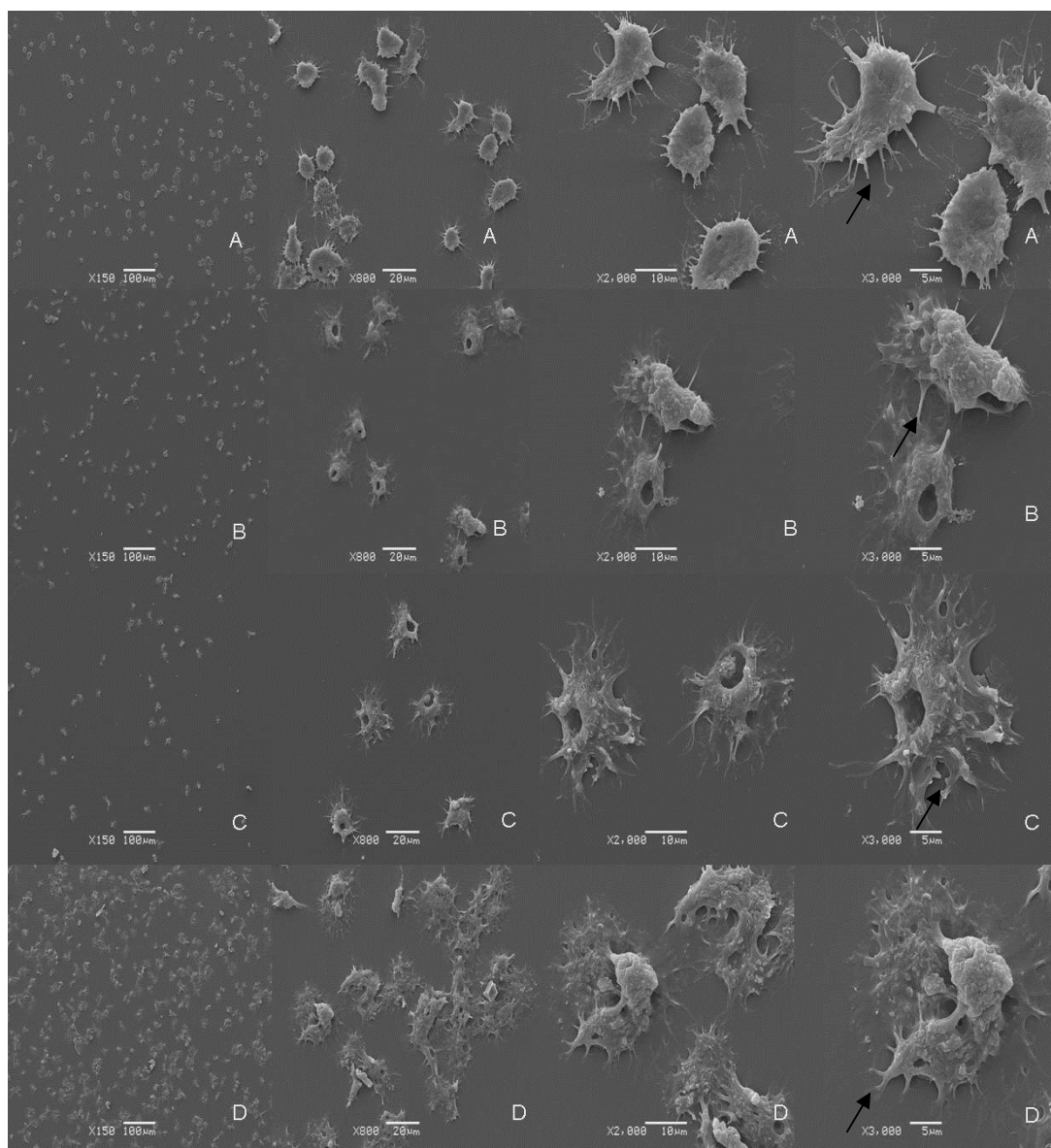


Figura 8. Microscopia Eletrônica de Varredura de trofozoíto de *Acanthamoeba*. (A) trofozoítos do isolado de referência de *Acanthamoeba* AP4 (ambiental); (B) trofozoítos do isolado de referência de *Acanthamoeba* AP2 (clínico); (C) trofozoítos do isolado de *Acanthamoeba* AR (clínico); (D) trofozoítos do isolado de *Acanthamoeba* AR11 (ambiental); Setas: Acantopódios.

Os trofozoítos dos quatro isolados apresentaram acantopódios, mas o número dessas projeções variou entre eles. Para fazer a contagem desses acantopódios o programa *Image J* foi utilizado, e o resultado da contagem está representado na **Figura 9**.

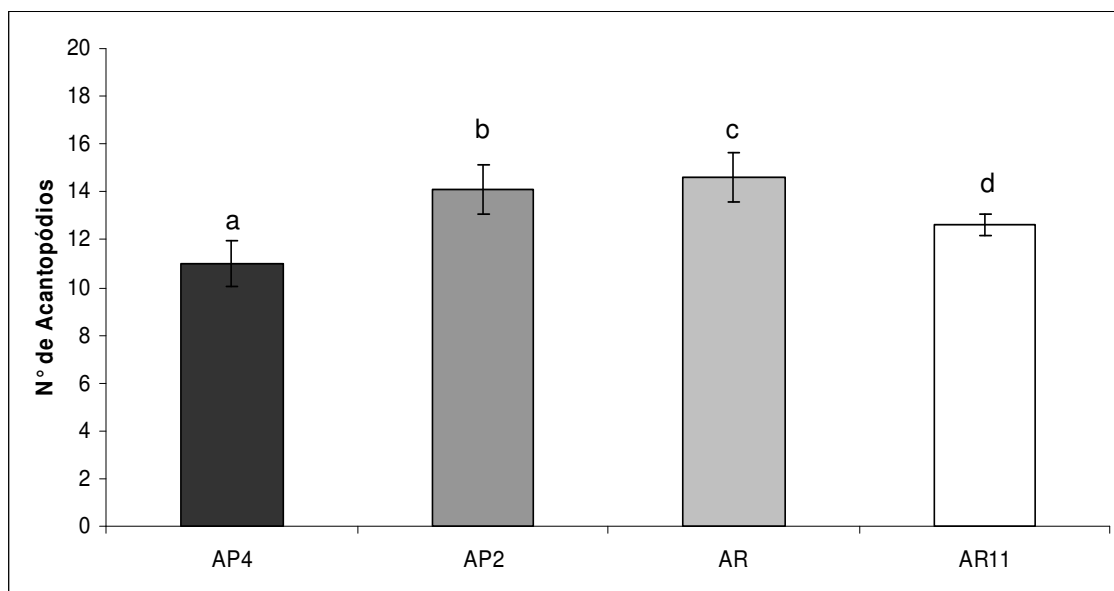


Figura 9. Número de acantopódios observados nos isolados clínicos (AP2 e AR) e nos isolados ambientais (AP4 e AR11). (a. b. c. d) Houve diferença significativa entre os grupos $P < 0,05$.

Como observado na **Figura 9**, os trofozoítos do isolado ambiental AP4 apresentaram um menor número de acantopódios quando comparado aos isolados clínicos (AP2 e AR). Interessantemente o isolado ambiental AR11 mostrou diferença em relação ao número de acantopódios do isolado ambiental AP4.

5.4 Caracterização protéica visualizada por eletroforese

O perfil eletroforético das proteínas foi avaliado a partir dos extratos totais solúveis tanto das amostras clínicas (AR e AP2), como das ambientais (AR11 e AP4). A **Figura 10** mostra que os perfis protéicos apresentaram uma acentuada complexidade visualizada pelo elevado número de bandas.

Foi observado um perfil eletroforético conservado em todas as amostras como também bandas exclusivas em cada um dos antígenos. Em todos os isolados, vários proteínas de elevado peso molecular estavam presentes, no entanto houve o predomínio de uma banda em torno de 130 kDa e outra em torno de 40 kDa conservadas nas quatro amostras.

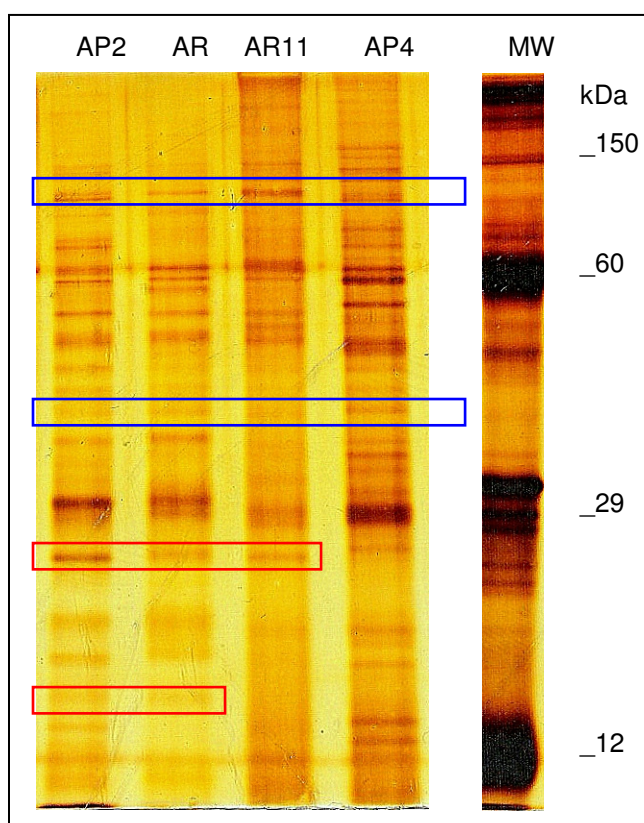


Figura 10. Eletroforese de proteínas de trofozoítos. As proteínas solúveis (3 µg) do isolado clínico (AR) e do isolado ambiental (AR11) e outras duas amostras de referência *A. poliphaga* #2 (AP2), e *A. poliphaga* #4 (AP4), foram separadas por SDS/PAGE, usando um gel a 12,5% de acrilamida/bisacrilamida. (□) proteínas conservadas e (□) proteínas exclusivas. (MW) marcador de peso molecular.

A fim de avaliar o extrato bruto solúvel de proteínas dos isolados clínicos e ambientais na tentativa de identificar características imunogênicas e antigênicas específicas que possam estar associadas ao potencial patogênico do gênero *Acanthamoeba*, anticorpos policlonais foram produzidos em camundongos. Para cada isolado de amebas foi utilizado um grupo de camundongos. Ao final do programa de imunização os soros de todos os camundongos de cada grupo foram unidos obtendo-se um *pool* de soros contendo os anticorpos policlonais para cada antígeno.

5.5 Caracterização dos anticorpos policlonais

ELISA

Foi feita a titulação do *pool* de anticorpos, específicos para cada antígeno, frente ao próprio imunógeno, e como mostrado na **Figura 11** o soro anti-AR11 foi o que apresentou maior título de anticorpos.

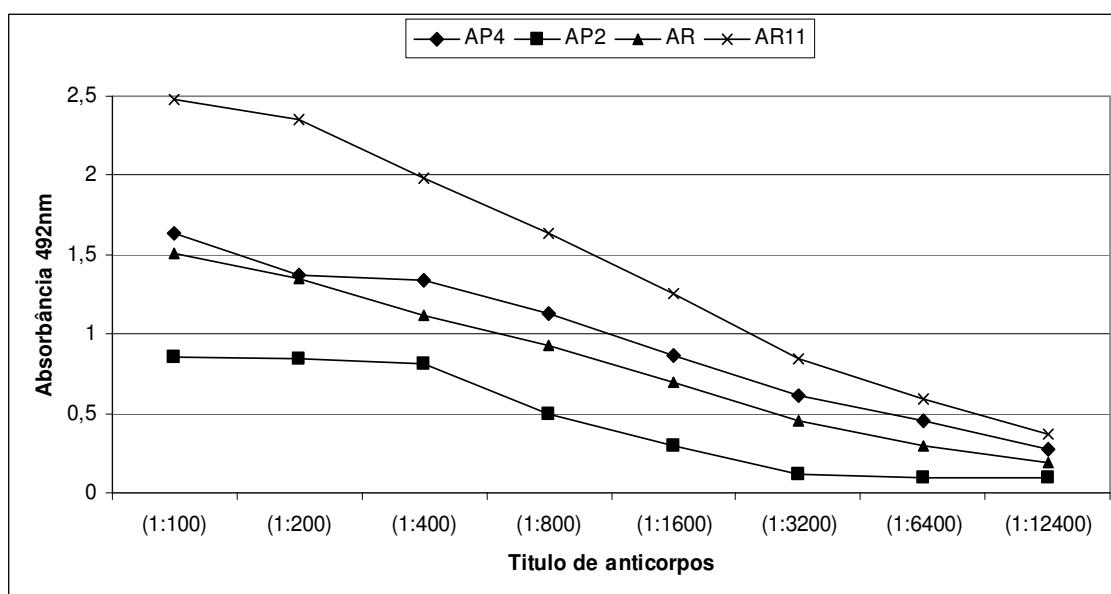


Figura 11. Titulação dos soros dos camundongos imunizados com os antígenos de *Acanthamoeba*, por ELISA indireto. Comparação entre o *pool* de soros dos camundongos imunizados com antígeno bruto dos isolados clínicos (AP2 e AR) e ambientais (AP4 e AR11). A placa foi sensibilizada com 10 µg/mL de cada antígeno bruto de trofozoíto de *Acanthamoeba*, os soros imunes foram testados contra o seu antígeno específico, nas diluições de 1:100 a 1:12400. A reação foi evidenciada pela adição de anti-imunoglobulina murina-peroxidase (Sigma, 1:4000), seguida da adição de substrato específico.

O *pool* dos soros dos animais imunizados com os diferentes antígenos também foi testado por ELISA frente aos diferentes imunógenos, a fim de verificar a reatividade cruzada dos anticorpos produzidos. Os soros foram testados na diluição de 1:400 tendo em vista uma maior homogeneidade da reatividade nessa diluição, como mostrado na titulação (**Figura 11**). Foi visto que os antígenos provenientes da amostra AR11 foram os mais imunogênicos quando comparado com os demais. Também foram observadas reações cruzadas entre todos os anticorpos estudados neste trabalho conforme **Figura 12**.

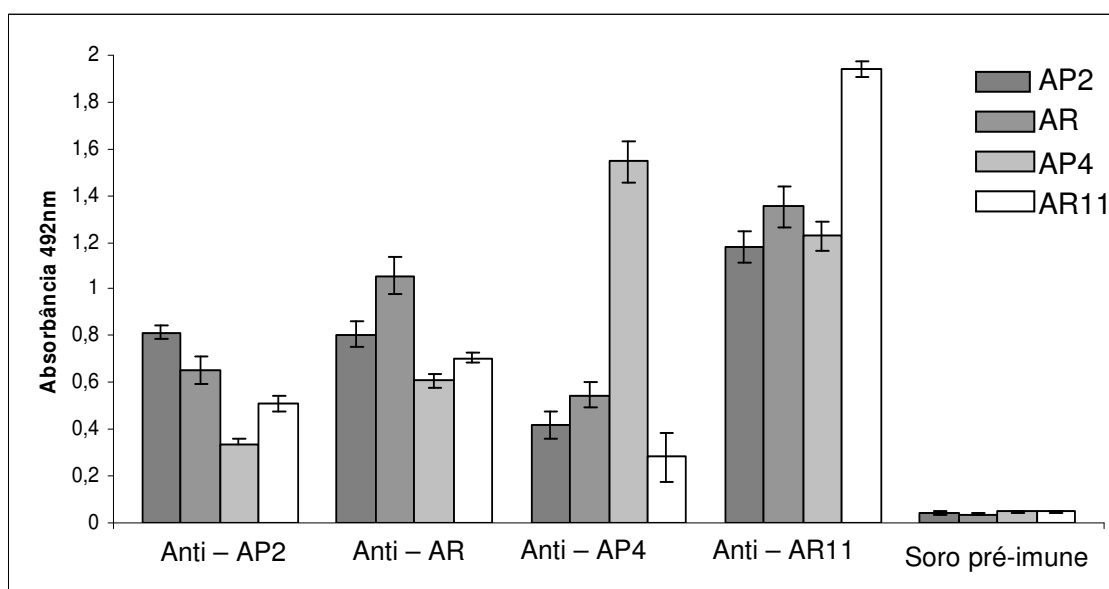


Figura 12. Reatividade cruzada dos anticorpos policlonais, produzidos contra os antígenos de AP2, AR, AP4 e AR11, por ELISA indireto. A placa foi sensibilizada com 10 µg/ml de cada antígeno bruto de trofozoíto de *Acanthamoeba*, os soros imunes foram testados contra o seu antígeno específico, na diluição de 1:400, e contra o antígeno não específico na mesma diluição. A reação foi evidenciada pela adição de anti-imunoglobulina murina-peroxidase (Sigma, 1:4000), seguida da adição de substrato específico. Houve diferença significativa entre todos grupos $P < 0,05$.

Western Blotting

Para verificar quais componentes protéicos estavam sendo reconhecidos e proporcionando a reatividade cruzada vista pelos ensaios de ELISA os antígenos dos isolados clínico (AR) e ambiental (AR11) e das amostras de referência *A. poliphaga* #2 (AP2) e *A. poliphaga* #4 (AP4) foram avaliados frente aos soros dos camundongos imunizados com esses quatro antígenos. Foram incubados separadamente, soro anti AR 1:400, soro anti AR11 1:2000, soro anti AP4 1:800 e soro anti AP2 1:200 com a membrana de nitrocelulose após eletrotransferência do gel SDS-PAGE contendo os antígenos de todos os isolados estudados neste trabalho.

A mesma similaridade do perfil eletroforético dos isolados foi observada no perfil imunogênico. Apesar dessa similaridade, a identificação de proteínas imunogênicas específicas a cada perfil pode ser visualizada (**Figura 13**).

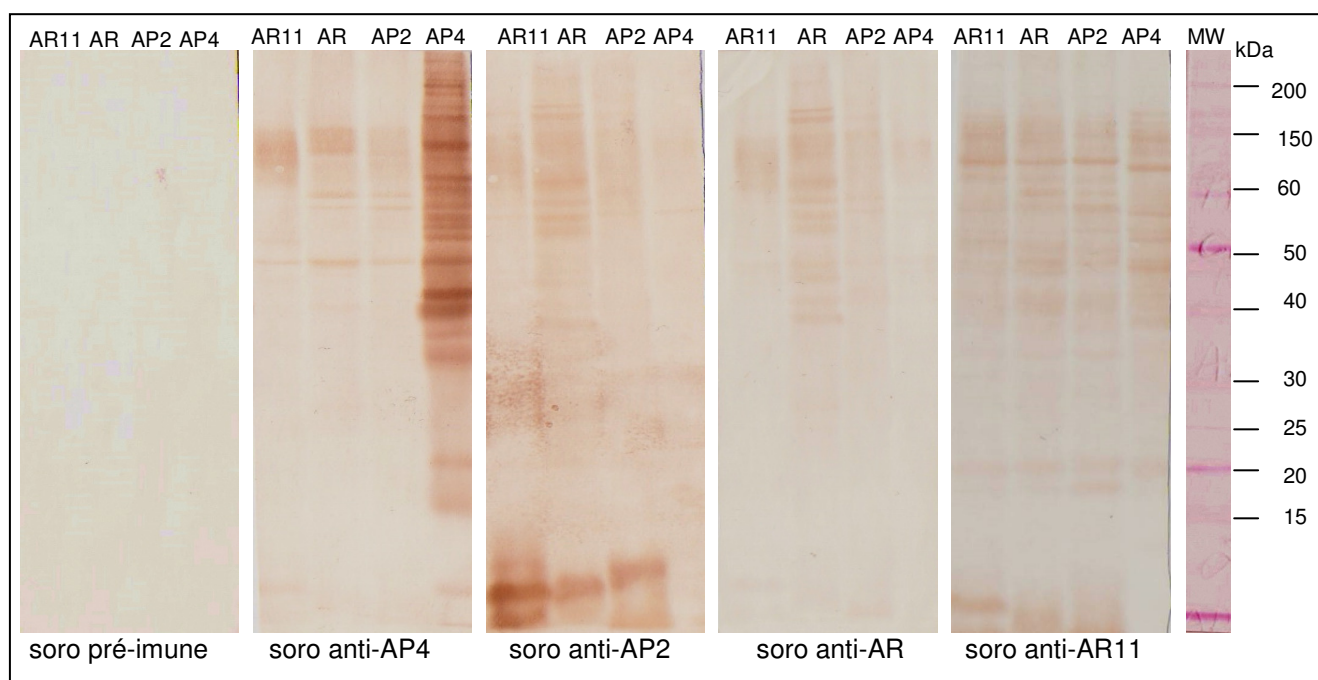


Figura 13. Reatividade dos anticorpos policlonais contra antígenos de trofozoítos de *Acanthamoeba* por Western blotting. As proteínas solúveis dos isolados clínico (AR) e ambiental (AR11) e das amostras de referência *A. poliphaga* #2 (AP2) e *A. poliphaga* #4 (AP4) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% e transferidas para membrana de nitrocelulose. A imuno-reatividade dos anticorpos policlonais foi avaliada frente aos antígenos específicos e não específicos. (MW) marcador de peso molecular.

Imunofluorescência

Os anticorpos policlonais foram testados por imunofluorescência a fim de verificar a capacidade de reconhecer os trofozoítos dos isolados de *Acanthamoeba* (**Figura 14**). As amebas foram marcadas com DAPI, reagente com afinidade por estruturas nucleares, para certificar a presença dos trofozoítos aderidos à lâmina. A reatividade dos anticorpos policlonais frente aos trofozoítos de *Acanthamoeba* foi evidenciada pela adição de um anticorpo anti-mouse conjugado a um fluoróforo (FITC). Todos os anticorpos foram capazes de reconhecer os trofozoítos.

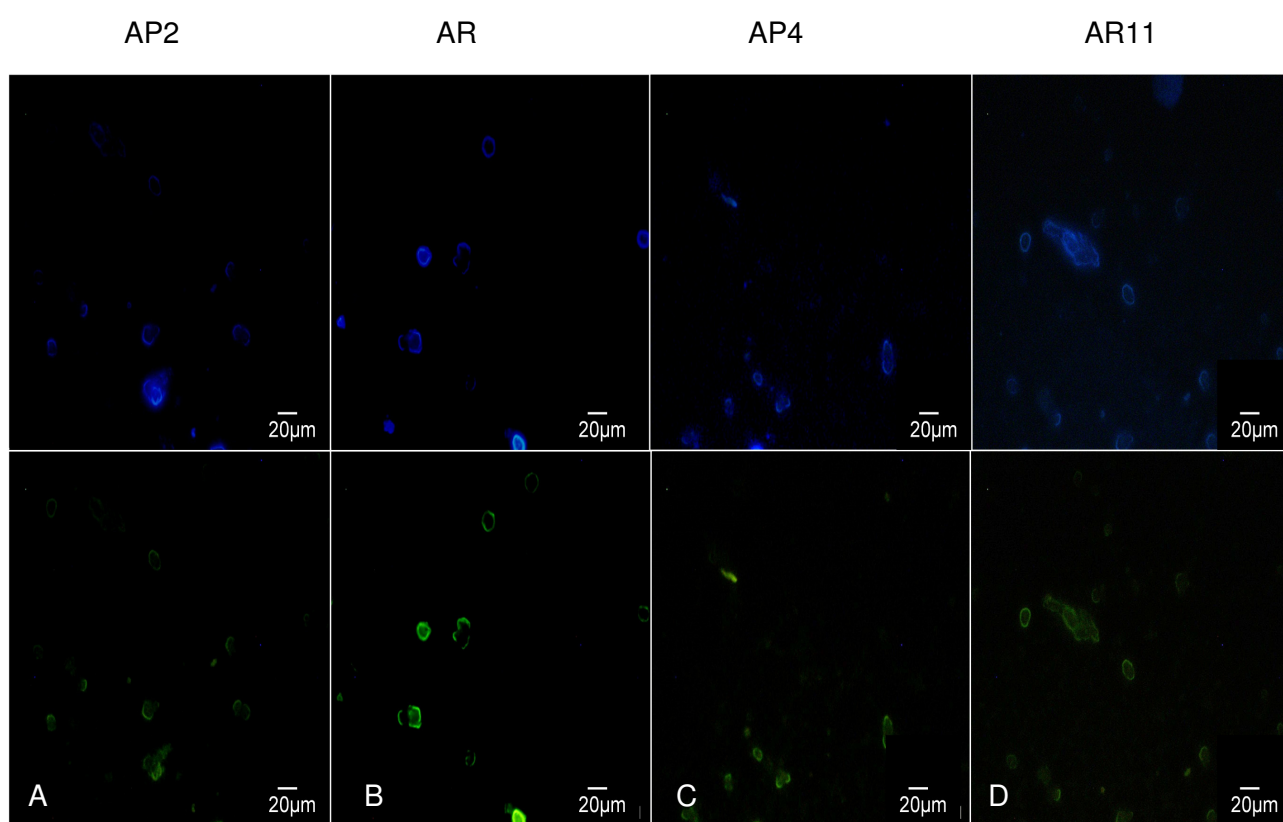


Figura 14. Imunofluorescência indireta com os anticorpos policlonais. (A) trofozoítos de AP2 em presença de soro anti-AP2; (B) trofozoítos de AR em presença de soro anti-AR; (C) trofozoítos de AP4 em presença de soro anti-AP4; (D) trofozoítos AR11 na presença de anti-AR11. Todos os antígenos foram testados na presença de soro murino pré-imune assim como na presença somente do conjugado (anti-mouse FITC) e em ambos não apresentaram reatividade (dados não mostrados).

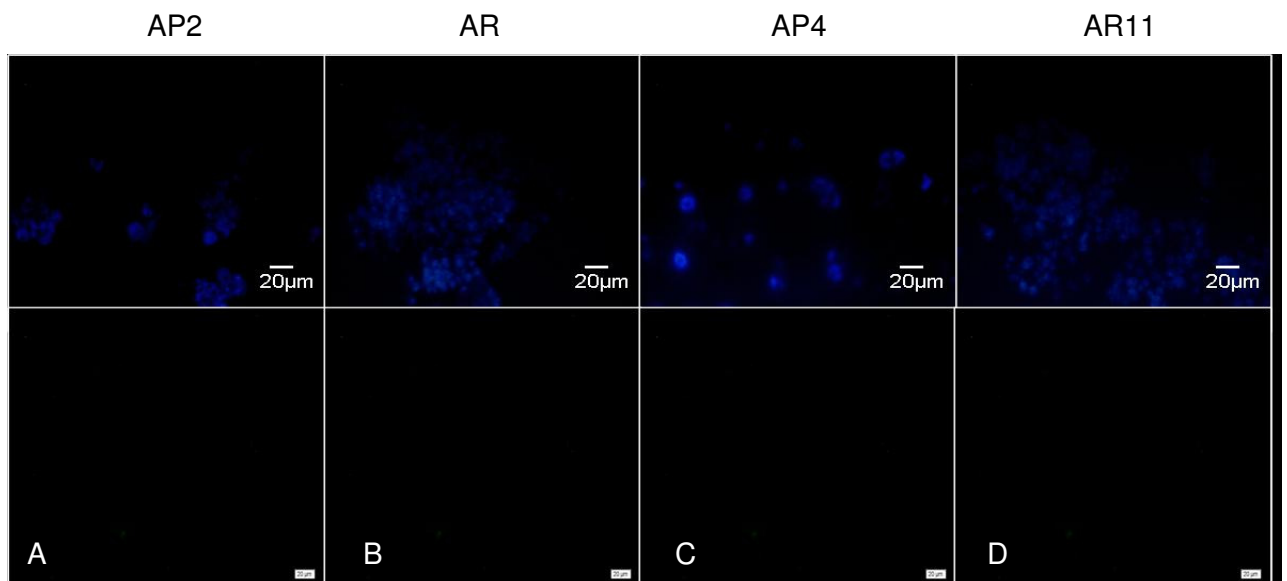


Figura 15. Imunofluorescência indireta com soro murino pré-imune. (A) trofozoítos de AP2 em presença de soro pré-imune; (B) trofozoítos de em presença de soro pré-imune; (C) trofozoítos de AP4 em presença de soro pré-imune; (D) trofozoítos AR11 em presença de soro pré-imune.

Ainda na tentativa de inferir potencial patogênico bem como diferenciar amostras de *Acanthamoeba*, foram produzidos anticorpos monoclonais. A partir da imunização e retirada do baço de um camundongo, células esplênicas foram fusionadas com células tumorais sp2/0 gerando hibridomas secretores de anticorpos.

5.6 Caracterização dos anticorpos monoclonais

ELISA

Após 15 dias da fusão de células tumorais sp2/0 com células do baço de camundongos Balb/C imunizados com o antígeno clínico AR, muitos hibridomas secretores de anticorpos monoclonais reativos aos antígenos de *Acanthamoeba* foram gerados conforme observado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Reatividade de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais produzidos contra o antígeno clínico de *Acanthamoeba* AR verificada pelo ensaio de ELISA.

HIBRIDOMAS	REATIVIDADE (Absorbância 492nm)
1E1	1,064*
1E5	0,445
1B6	0,461
1F7	0,498
1F10	0,606*
2C2	0,364*
2A3	0,449
2C3	0,331*
2G9	0,449
2F12	0,437
3A1	0,620*
3H3	0,769*
3D6	0,392
3A8	0,369
3E12	0,424
4H3	0,466*
4E5	0,460*
4F6	0,443*
4A8	0,432

*Hibridomas selecionados para clonagem

Para a seleção dos hibridomas foi analisado o valor da reatividade e a quantidade de células em cada poço de clonagem. Poços com menor número de células e que apresentaram maior reatividade sugerem a presença de hibridomas secretores de anticorpos mais específicos. Foi esse o critério utilizado para a seleção dos hibridomas da **Tabela 4**.

Dentre os hibridomas gerados nove foram selecionados (**Tabela 4**) para serem clonados e individualizados por diluição limitante com o objetivo de isolar células produtoras de anticorpos monoclonais. Dez clones apresentaram reatividade frente ao antígeno AR quando avaliados por ELISA (**Figura 16**).

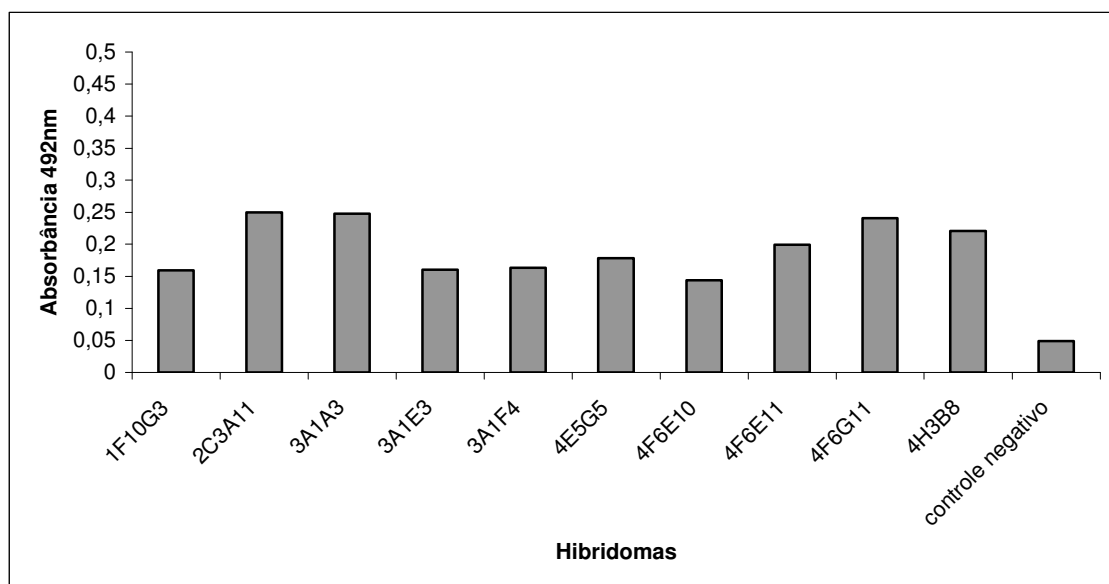


Figura 16. Reatividade dos anticorpos monoclonais, produzidos contra o antígeno de AR, por ELISA indireta. A placa foi preparada com 50 µg/mL do antígeno bruto de trofozoíto de *Acanthamoeba* do isolado clínico AR, 100 µL de sobrenadantes celulares foram testados contra o seu antígeno AR. A reação foi evidenciada pela adição de anti-imunoglobulina murina-peroxidase (Sigma, 1:4000), seguida da adição de substrato específico.

Esses dez clones também foram testados por ELISA frente aos antígenos provenientes das demais amostras AP4, AP2 e AR11 (**Tabela 5**).

Tabela 5. Reatividade dos anticorpos monoclonais frente aos dois isolados clínicos e aos dois isolados ambientais, por ELISA indireto.

	Isolado AP2	Isolado AR	Isolado AP4	Isolado AR11
	Absorbância 492nm			
1F10G3	0,051	0,159	0,046	0,049
2C3A11	0,219	0,250	0,045	0,118
3A1B4	0,112	0,16	0,047	0,132
3A1A3	0,259	0,248	0,044	0,215
3A1F4	0,141	0,163	0,049	0,065
4E5G5	0,050	0,178	0,044	0,059
4F6E10	0,055	0,144	0,045	0,067
4F6E11	0,058	0,199	0,042	0,072
4F6G11	0,059	0,241	0,038	0,078
4H3B8	0,061	0,221	0,049	0,043

Os anticorpos monoclonais apresentaram uma reatividade inferior aos policlonais, mas foram capazes de reconhecer de modo diferenciado os antígenos. O hibridoma 3A1A3 foi escolhido para ser purificado e melhor caracterizado por ser capaz de reconhecer três dos quatro isolados testados com maior intensidade.

Após a purificação do anticorpo monoclonal 3 (mAb3) por coluna de afinidade, o isotipo do anticorpo foi determinado utilizando um kit de isotipagem para anticorpos monoclonais murinos, como detalhado em materiais e métodos. O anticorpo mAb3 foi isotipado como sendo uma IgG1 λ .

Para saber qual componente este anticorpo reconhece no complexo perfil proteico dos isolados clínicos (AP2 e AR) e ambiental AR11 que não está sendo reconhecido no perfil proteico do isolado ambiental AP4 conforme os dados mostrados na **Tabela 5**, realizou-se um *Western blotting*.

Western Blotting

Foi verificado o perfil de reconhecimento das proteínas dos isolados clínico (AR), ambiental (AR11), e das cepas *A. poliphaga* #2 (AP2) e *A. poliphaga* #4 (AP4), frente ao anticorpo monoclonal mAb3. Observou-se que o anticorpo monoclonal foi capaz de reconhecer proteínas de três dos quatro isolados estudados. Corroborando com o que foi visto nos ensaios de ELISA (**Figura 17**). O anticorpo mAb3 foi capaz de reconhecer proteína de alta massa molecular nos isolados clínicos e no isolado ambiental AR11, mas não foi capaz de reconhecer nenhum componente no perfil protéico da amostra ambiental de referência AP4.

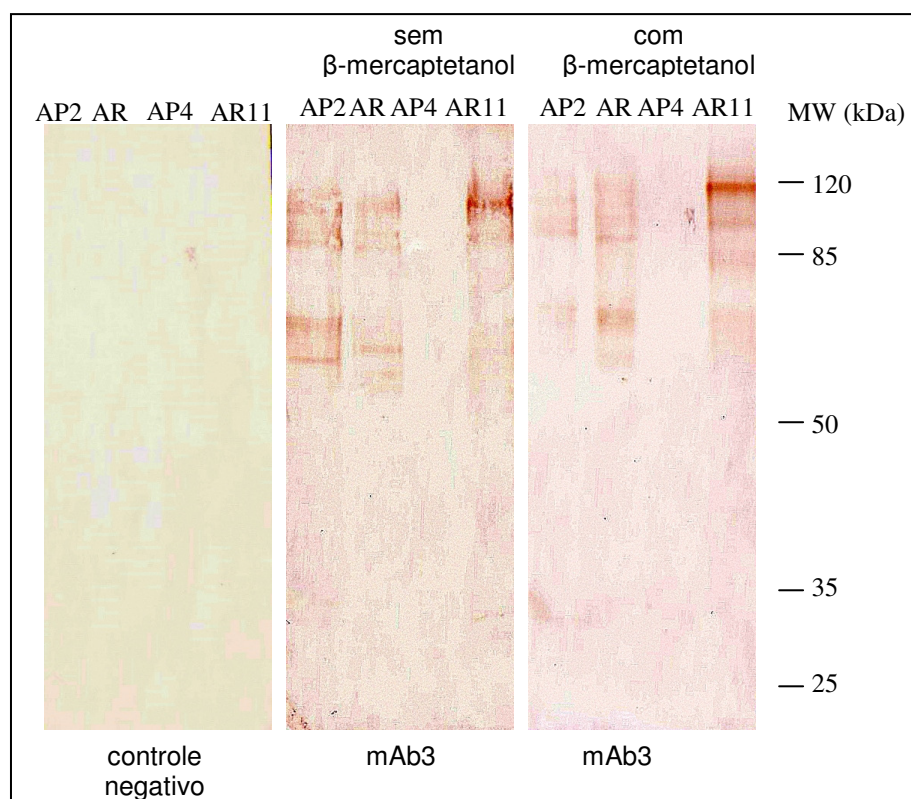


Figura 17. Western Blotting do anticorpo monoclonal mAb3. As proteínas solúveis dos isolados clínico (AR), ambiental (AR11), e das cepas *A. poliphaga* #2 (AP2) e *A. poliphaga* #4 (AP4) foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose. A imuno-reatividade dos anticorpos foi testada frente aos diferentes antígenos. Controle negativo = sobrenadante celular com anticorpo monoclonal irrelevante. (MW) marcador de peso molecular.

Imunofluorescência

O anticorpo monoclonal mAb3 foi testado por imunofluorescência a fim de verificar a capacidade dos mesmos de reconhecer as diferentes amostras de *Acanthamoeba* (**Figura 18**).

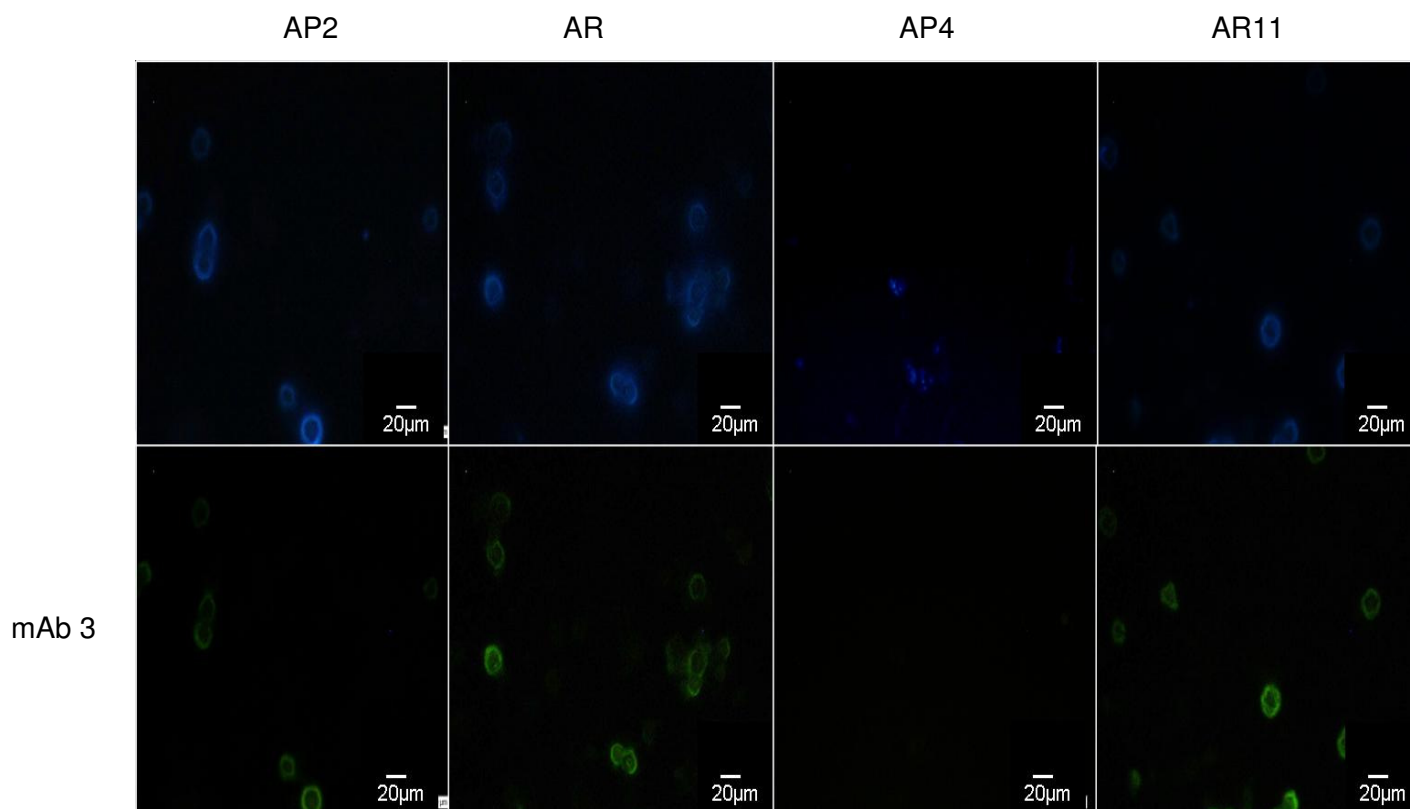


Figura 18. Imunofluorescência indireta com o anticorpo monoclonal 3 (mAb3) frente aos trofozoítos de AP2, AR, AP4 e AR11. Todos os antígenos foram testados na presença de soro murino pré-imune assim como na presença somente do conjugado (anti-mouse FITC) e em ambos não apresentaram reatividade (dados não mostrados).

6. DISCUSSÃO

Os protozoários do gênero *Acanthamoeba* estão entre os mais prevalentes encontrados no meio ambiente. Este gênero é composto por diversas espécies que podem ou não apresentar risco ao homem. Algumas linhagens são capazes de causar infecções humanas, e no que se refere à patogenicidade podem ser observadas diferenças significativas mesmo entre isolados de uma mesma espécie (DE JONCKHEERE, 1980; WALOCHNIK *et al*, 2000; KHAN, 2003).

Muitos estudos foram e vêm sendo realizados na tentativa de esclarecer algumas questões importantes sobre a condição de patogenicidade desses organismos. Nesse sentido, deve ser dada importância a componentes biológicos específicos e que podem ser requeridos para que *Acanthamoeba* seja capaz de causar a doença. Esta questão foi avaliada neste trabalho por meio do estudo de quatro isolados de *Acanthamoeba* de origens clínica e ambiental, abordando aspectos fisiológicos, morfológicos e imunoquímicos, com intuito de se conhecer um pouco mais sobre esse assunto.

Primeiramente, foi avaliado o perfil de crescimento entre os quatro isolados de *Acanthamoeba* (**Figura 5**). Em nossos achados foi possível identificar, por meio das análises estatísticas, que existem diferenças na taxa de crescimento das amostras em todos os tempos avaliados. As variações das taxas de crescimento dentro dos grupos de *Acanthamoeba* indicam que a velocidade ou taxa de crescimento pode ser variável entre diferentes isolados, refletindo características individuais em sua capacidade de adaptação ao cultivo *in vitro* (KHAN *et al*, 2003; ROCHA-AZEVEDO *et al*, 2007).

Quando agrupadas as amostras clínicas (AP2 e AR) e as amostras ambientais (AP4 e AR11) e analisadas até o tempo de 36 horas (**Figura 6**), foi visto que as amostras clínicas apresentaram maior crescimento, corroborando com os achados da literatura (KHAN *et al*, 2003; ROCHA-AZEVEDO *et al*, 2007). De acordo com os dados apresentados por Walochnik *et al* (2000), cepas virulentas de *Acanthamoeba* isoladas de casos clínicos crescem mais rapidamente que as amebas de isolados ambientais. Rocha-Azevedo *et al* (2007) compararam dois isolados de *Acanthamoeba polyphaga*, um clínico e outro ambiental e verificaram que o isolado patogênico apresentou tempo de duplicação de 16 h, enquanto o

isolado de água doce dobrou depois 31 h. Essa taxa de crescimento depende da composição do meio de crescimento, condições ambientais, como a temperatura, pH, disponibilidade de água, entre outros fatores (KHAN, 2001). Khan *et al* (2006) sugerem que isolados de *Acanthamoeba* com crescimento mais rápido podem estar relacionados a um maior potencial patogênico da ameba, que dessa maneira podem estabelecer uma infecção mais facilmente que os isolados de crescimento lento, uma vez que o primeiro seria capaz de possuir uma adaptação mais rápida, resultando em um menor intervalo de geração, obtendo assim um número de amebas suficientes para iniciar uma infecção no hospedeiro. O perfil de crescimento pode ser útil também para se conhecer o rendimento e tempo necessário para obter culturas ricas e utilizá-las em experimentos laboratoriais.

Também foi avaliada a capacidade dos trofozoítos se transformarem em cistos (encistamento). Observou-se que os isolados ambientais foram capazes de encistar mais rapidamente que os isolados clínicos (**Figura 7**). Acredita-se que esta habilidade, presente nos isolados ambientais, pode ser importante para adaptação a novos ambientes, sobrevivência em condições adversas o que é muito comum na natureza, permitindo assim o estabelecimento das amebas nos mais variados habitats (WALOCHNIK *et al*, 2004). Esses resultados divergem dos encontrados pela equipe de Rocha-Azevedo (2007), onde foi observado que amebas isoladas de ceratite amebiana apresentavam encistamento mais rápido que amebas da mesma espécie, porém de origem ambiental. A equipe acredita que essa habilidade, presente no isolado clínico pode ser importante para a adaptação a um novo ambiente, neste caso a córnea.

Juntamente com as avaliações fisiológicas as características morfológicas podem fornecer informações importantes sobre o potencial patogênico de diferentes isolados de *Acanthamoeba* (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Sabe-se que as formas trofozoíticas de *Acanthamoeba* não têm uma morfologia distinta, no entanto, elas expressam projeções citoplasmáticas denominadas acantopódios em sua superfície, que podem desempenhar um papel fundamental na patogênese das infecções por *Acanthamoeba* (KHAN, 2001; PETTIT *et al*, 1996). Morfologicamente, foram observadas diferenças entre os isolados aqui estudados (**Figura 8**), verificou-se que existe um maior número de projeções nas amostras (AP2 e AR) clínicas em relação à amostra AP4. A amostra AR11, de maneira interessante, parece estar

numa interface desses dois grupos, sugerindo um possível potencial patogênico desse isolado (**Figura 9**).

Segundo Khan (2001), a ligação de *Acanthamoeba* patogênica a células epiteliais da córnea é mediada por acantopódios. Ainda foi verificado que *Acanthamoeba* com menor número de acantopódios (não patogênica) não apresenta ligação com as células epiteliais da córnea sugerindo que essas estruturas podem funcionar como um prolongamento de contato inicial com as células do hospedeiro. Em geral, estudos sugerem que acantopódios representam um traço de virulência (KHAN, 2003). Mas, ao contrário dos resultados obtidos por Khan e colaboradores (2001, 2003), a equipe de Rocha-Azevedo (2007), mostrou que o isolado patogênico, estudado em seu trabalho, apresentou menos acantopódios quando comparado com outro isolado dessa mesma espécie encontrado na água. No entanto, mais estudos são necessários para estabelecer plenamente o papel dessas projeções na patogênese da *Acanthamoeba*.

Conforme exposto, quando avaliados alguns dos parâmetros fisiológicos ou morfológicos, há dados divergentes no que se refere a características que possam indicar tendência à patogenicidade. Estas divergências reforçam a necessidade de avaliação de um maior número de isolados, para certificar se realmente existe associação entre tais parâmetros com a capacidade de causar doenças ou se estas características não dependem da origem clínica ou ambiental.

Outra abordagem além dos critérios morfológicos e fisiológicos é a presença e expressão de alguns componentes específicos, os quais poderiam ser empregados para inferir sobre a patogenicidade dos isolados de *Acanthamoeba* (WALOCHNIK *et al*, 2004). Alguns trabalhos sugerem que a patogenicidade em *Acanthamoeba* é uma propriedade distinta de certas cepas (WALOCHNIK *et al*, 2000). O perfil protéico vem sendo utilizado para diferenciar *Acanthamoeba* patogênica de não patogênica, mas os mecanismos moleculares de patogenia da *Acanthamoeba* ainda não são totalmente conhecidos (NIEDERKORN *et al*, 1999; KHAN, 2003).

A análise dos perfis eletroforéticos dos antígenos solúveis dos isolados de *Acanthamoeba* observados neste trabalho apresentaram uma mistura protéica complexa de componentes com massas que variaram entre 10 e 200 kDa (**Figura 10**). Foi visto, por exemplo, em todas as amostras a presença de proteínas com massa aproximada de 40 kDa, que pode ser uma actina um componente conservado de citoesqueleto presente nos trofozoítos de *Acanthamoeba* e encontrado em maior

quantidade em isolados com presença de maior número de acantopódios. A equipe de pesquisa de Walochnik *et al* (2004) associou o perfil protéico de antígenos de diferentes isolados de *Acanthamoeba* com a classificação sugerida por Pussard e Pons (1977) onde o grupo morfológico II apresentou uma banda dominante de 44 kDa. Há relatos da importância do papel do citoesqueleto no processo de adesão e invasão em tecidos pelas amebas, e a actina parece estar envolvida nesses processos como em outros também. A actina é uma proteína bem conservada entre células de eucariotos e na *Acanthamoeba* é identificada como uma proteína com peso molecular de 44 kDa. Esta proteína está envolvida em muitas funções vitais celulares tais como motilidade celular (BRETSCHER, 1991; CONDEELIS, 1993; KABSCH e VANDEKERCKHOVE, 1992; MITCHISON, 1995; PALOMO *et al*, 2008), adesão (GUMBINER, 1996) e fagocitose (SWANSON e BAER, 1995). Outros estudos proteômicos devem ser feitos para melhor caracterização desse achado.

Outra proteína também verificada no perfil de todos os isolados aqui analisados encontra-se em torno de 130 kDa podendo ser uma proteína ligadora de manose (MBP) (**Figura 10**). A proteína ligadora de manose (MBP) esta presente na superfície amebóide de *Acanthamoeba* e já foi amplamente caracterizada (GARATE *et al*, 2004). Trata-se de uma proteína transmembrana com peso molecular de 400 kDa, na sua forma nativa, apresentando subunidades de aproximadamente 130 kDa (IMBERT-BOUYER *et al*, 2004; GARATE *et al*, 2005). A adesão dos trofozoítos de *Acanthamoeba* a células hospedeiras é um dos primeiros passos para que se instale a infecção. Já está bem estabelecido que essa adesão é mediada por uma proteína ligadora de manose (MBP). Estudos ainda sugerem que o potencial patogênico de *Acanthamoeba* pode estar diretamente correlacionado com o nível de expressão da MBP.

A utilização de anticorpos policlonais e monoclonais pode ser útil na identificação e caracterização tanto de componentes específicos, como de conservados nas diferentes amostras de *Acanthamoeba* e ainda, pode indicar a presença de moléculas associadas ou não a patogenicidade (IMBERT-BOUYER *et al*, 2004; GARATE *et al*, 2005). Nesse sentido as amostras AP4, AP2, AR e AR11A foram devidamente preparadas e utilizadas como imunógenos para a produção de anticorpos policlonais e monoclonais.

Finalizado o programa de imunização, foi visto que todos os antígenos produzidos a partir dos isolados de *Acanthamoeba*, usados nesse estudo, foram

capazes de induzir a produção de anticorpos policlonais. Os anticorpos produzidos foram avaliados por ELISA, *Western blotting* e imunofluorescência. Foram verificadas reações cruzadas de todos os anticorpos frente a todas as amostras por ELISA e *Western blotting*. Tal reatividade pode se justificar pela presença de componentes conservados em todos os isolados, que podem estar associados à adesão, mobilidade, ciclo celular e outros (KHAN *et al*, 2003). A imunorreatividade foi significativamente mais evidente contra o isolado de poeira da residência do paciente com ceratite (AR11) quando comparado aos demais isolados (**Figura 12**). MERGERYAN (1991) testou soros humanos frente a amostras patogênicas e não patogênicas e inferiu que a maior imunorreatividade encontrada para as amostras não patogênicas poderia estar associada à ampla distribuição destas no ambiente, o que possibilitaria uma estimulação antigênica constante. Tendo em vista que o biotério onde foram mantidos os animais desse projeto não se encontrava em condições totalmente assépticas, e considerando a ubiquidade de *Acanthamoeba* no ambiente, tal exposição pode ter ocorrido.

Dentre os antígenos indutores de anticorpos policlonais, aqueles provenientes da cepa AP4 foi o que promoveu uma maior especificidade nos seus anticorpos, ou seja, essa amostra parece apresentar componentes mais específicos, e que talvez possam estar associados a características ambientais (**Figura 13**). Tais características podem estar relacionadas à necessidade de uma maquinaria protéica mais elaborada atribuída à rápida adaptação as divergências ambientais (WALOCHNIK *et al*, 2000).

Outro fato observado foi que a amostra AR11, apesar de ter sido isolada do ambiente, parece ter um perfil imunogênico que se aproxima mais das amostras clínicas (AP2 e AR), o que pode sugerir um potencial patogênico desse isolado, isso foi corroborado com ensaios em que foi empregado o anticorpo monoclonal 3. Um estudo anterior com estas amostras AP4, AP2, AR e AR11 (DUARTE, 2010) demonstrou que elas apresentam sequência nucleotídica parcial do 18S rDNA (fragmento ASA.S1) bastante próxima a do isolado AR, com no máximo 5 nucleotídeos diferentes, além de apresentarem tolerância à 37°C, característica que seria predominante em isolados patogênicos (DE JONKHEERE, 1980). Cabe lembrar que essa amostra foi isolada da poeira do apartamento do mesmo paciente em que foi isolada a amostra clínica AR, responsável por induzir a ceratite.

Na tentativa de fazer um estudo mais refinado e direcionado para componentes específicos do extrato bruto de antígeno, anticorpos monoclonais foram produzidos. Dez hibridomas secretores de anticorpos monoclonais dirigidos contra os antígenos do isolado clínico AR foram obtidos. Dentre eles, o anticorpo monoclonal três (mAb3) foi escolhido para maiores caracterizações pois apresentou reatividade com a maioria dos antígenos (**Tabela 5**). O mAb3 foi capaz de identificar um epítipo que se repete em mais de um componente presentes nos isolados patogênicos (AP2 e AR) e no isolado ambiental AR11, mas não foi capaz de identificar esse mesmo componente no isolado não patogênico de referência AP4 (**Figura 17**). Tais resultados fortalecem a idéia de que as amostras aqui estudadas apresentam componentes conservados. No entanto foi interessante observar que os componentes reconhecidos pelo mAb3 não estavam presentes na amostra ambiental AP4, o que permite reforçar a idéia de que esse isolado apresenta componentes muito específicos ou ainda que as outras três amostras compartilhem domínios antigênicos. Neste último caso, tendo em vista que a amostra AR11 foi extraída da poeira da casa de um paciente, poderia-se especular sobre o potencial patogênico dessa amostra associado a similaridade da mesma com as amostras clínicas no que se refere a morfologia dos trofozoítos. Dados da literatura discutem sobre o potencial patogênico de proteínas ligadoras de manose, que apresentam massa molecular semelhante ao componente identificado pelo mAb3, em torno de 130 kDa (GARATE *et al*, 2005). Foi visto também que mesmo em condições redutoras e não redutoras esse anticorpo monoclonal foi reativo a mais de uma banda, que pode indicar a presença de um epítipo que se repete em mais de um componente presente nos antígenos brutos de AP2, AR e AR11. Uma melhor caracterização desse componente é necessária para a identificação do mesmo e a confirmação do seu papel no desenvolvimento da infecção.

Os resultados obtidos com os experimentos de imunofluorescência confirmam a reatividade dos policlonais, e reforçam os resultados do anticorpo monoclonal mAb3 não sendo capaz de identificar trofozoítos da amostra AP4.

Critérios imunológicos, bioquímicos e fisiológicos têm sido aplicados na identificação de diferentes espécies de *Acanthamoeba*. Os resultados obtidos através destas abordagens podem ajudar no entendimento dos mecanismos de patogenicidade ao identificar componentes importantes nesse processo (NIEDERKORN *et al*, 1999; KHAN, 2003; TURNER *et al*, 2005). Até o momento,

nenhum marcador confiável de patogenicidade de *Acanthamoeba* foi descrito. Várias técnicas têm sido usadas em um esforço para classificar os diferentes isolados de *Acanthamoeba*.

A patogenicidade das espécies de *Acanthamoeba* é dada por uma soma de múltiplos processos, que devem ser analisados em conjunto para o sucesso da identificação de diferentes isolados (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; KHAN, 2006). Tomados em conjunto, nossos resultados demonstram que um grupo de características pode ajudar na diferenciação de isolados de *Acanthamoeba* e ainda sugerir um possível potencial patogênico.

7. CONCLUSÕES

Primeiramente, foi avaliado o perfil de crescimento entre os quatro isolados de *Acanthamoeba* (AP4, AP2, AR E AR11).

- Foi possível identificar diferenças na taxa de crescimento das amostras em todos os tempos avaliados.
- Amostras clínicas apresentaram crescimento mais rápido quando comparadas as amostras ambientais

Também foi avaliada a capacidade dos trofozoítos se transformarem em cistos (encistamento).

- Observou-se que os isolados ambientais foram capazes de encistar mais rapidamente que os isolados clínicos.

A MEV permitiu a visualização de estruturas típicas (acantopódios) nos trofozoítos.

- Existe um maior número de projeções nas amostras (AP2 e AR) clínicas em relação à amostra ambiental AP4.
- A amostra AR11, de maneira interessante, parece estar numa interface desses dois grupos.

A análise dos perfis eletroforéticos dos antígenos somáticos dos isolados de *Acanthamoeba* apresentaram uma mistura protéica complexa de componentes com massas que variaram entre 10 e 200 kDa.

- Foi verificada a presença de componentes específicos e conservados nos isolados.

Foram produzidos anticorpos policlonais e monoclonais na tentativa de identificar e caracterizar esses componentes específicos e conservados.

- Todos os antígenos foram capazes de induzir a produção de anticorpos policlonais.
- Foi verificada reatividade cruzada de todos os anticorpos policlonais produzidos.

-
- A amostra AR11 foi a mais imunogênica e a mais antigênica dentre as estudadas.
 - O antígeno AP4 foi o que promoveu uma maior especificidade nos seus anticorpos.

Nove hibridomas secretores de anticorpos monoclonais dirigidos contra os antígenos do isolado clínico AR foram obtidos.

- Um foi escolhido para maiores caracterizações pois apresentaram reatividade com a maioria dos antígenos.
- O mAb3 foi capaz de identificar proteínas nos isolados clínicos (AP2 e AR) e no isolado ambiental AR11, mas não foi capaz de identificar esses mesmos componentes no isolado não patogênico de referência AP4.

Tendo em vista que a amostra AR11 foi extraída da poeira da casa de um paciente, poderia se especular sobre o potencial patogênico dessa amostra associado a similaridade da mesma com as amostras clínicas no que se refere a morfologia dos trofozoítos e imunoquímica dos antígenos.

8. PERSPECTIVAS

Caracterização proteômica dos antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais.

Avaliar a presença desses antígenos em diferentes isolados.

Imunofluorescência dos anticorpos frente aos cistos.

Criação e avaliação de um painel de sorotipagem a partir dos anticorpos monoclonais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADL, S. M., SIMPSON, A. G., FARMER, M. A., ANDERSEN, R. A., ANDERSON, O. R., BARTA, J. R., BOWSER, S. S., BRUGEROLLE, G., FENSOME, R. A., FREDERICQ, S., JAMES, T. Y., KARPOV, S., KUGRENS, P., KRUG, J., LANE, C. E., LEWIS, L. A., LODGE, J., LYNN, D. H., MANN, D. G., MCCOURT, R. M., MENDOZA, L., MOESTRUP, O., MOZLEY-STANDRIDGE, S. E., NERAD, T. A., SHEARER, C. A., SMIRNOV, A. V., SPIEGEL, F. W., TAYLOR, M. F. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **J Eukaryot Microbiol.** 52: 399 - 451, 2005.

ALVARENGA L. S., FREITAS D., LIMA A. L. H. Ceratite por *Acanthamoeba*. **Arq. Bras. Oftalmol.** 63: 2, 2000.

ALVARENGA L. S., FREITAS, D. Ceratite dendritiforme em usuários de lentes de contato. **Arq. Bras. Oftalmol.** 66: 4, 2003.

ALIZADEH, H., PIDHERNEY, M. S., MCCULLEY, J. P. E NIEDERKORN, J. Y. Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumor cells by a pathogenic free-living amoeba. **Infect. Immun.** 62: 1298 -1303, 1994.

ARMSTRONG, M. The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. **Infect. Dis. Rev.** 2: 65 – 73, 2000.

BERKE, G. Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Lymphocyte triggered internal target disintegration. **Immunol. Today.** 12: 396 – 399, 1991.

BLACKSTOCK W.P., WEIR M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends Biotechnol.** 17: 121-127, 1999.

BUTT, C. G., BARO C., KNORR, R. W. *Naegleria* (sp) identified in amebic encephalitis. **Am. J. Clin. Pthol.** 50: 568 – 574, 1968.

CASTELLANI, A. An amoeba found in cultures of a yeast: preliminary note. *J. Trop. Med. Hyg.* 33: 160, 1930.

CERVA, L. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri* occurrence of antibodies in man. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 33: 99 – 103, 1989.

CHOMICZ, L., PADZIK, M., GRACZYK, Z., STAROSCIAK, B., GRACZYK, T. K., NAPRAWSKA, A., OLEDZKA, G., SZOSTAKOWSKA, B. *Acanthamoeba castellanii*: In vitro effects of selected biological, physical and chemical factors. *Exp Parasitol.* V6, 2010.

CULBERTSON, C. G., SMITH, J. W., MINNER, H. *Acanthamoebae*: observations on animal pathogenicity. *Science.* 127: 1506, 1958.

CURSONS, R. T. M., BROWN, T. J., KEYS, E. A., MORIARTY, K.M. E TILL, D. Immunity pathogenic free-living amoeba: role of humoral antibody. *Infect. Immun.* 29: 401 – 407, 1980.

DE JONCKHEERE, J. F. Growth characteristics cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 681 – 685, 1980.

DE JONCKHEERE, J. F. Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* 13: 385 -387, 1991.

DELUOL, A. M., TEILHAC, M. F., POIROT, J. L., MASLO, C., LUBOINSKI, J., ROZENBAUM, W. E CHATELET, F. P. Cutaneous lesions due to *Acanthamoeba* sp. in a patient with AIDS. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43: 130-131, 1996.

ERTABAKLAR, H., DAYANIR, V., APAYDIN, P., ERTUG, S., WALOCHNIK, J. Case report: *Acanthamoeba* keratitis. *Turkiye Parazit. Derg.* 33: 283 – 285, 2009.

FERRANTE, A., E ROWAN-KELLY, B. Activation of the alternative pathway of complement by *Acanthamoeba culbertsoni*. **Clin. Exp. Immunol.** 54: 477 – 485, 1983.

FERRANTE, A. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. **Parasite Immunol.** 13: 31 – 47, 1991.

FERRANTE, A. Immunity to *Acanthamoeba*. **Rev. Infect. Dis.** 5: 403 – 409, 1991.

FREDERICK, L., SCHUSTER, GOVINDA S., VISVESVARA. Free-living as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for Parasitology.** 34: 1001 – 1027, 2004.

FORONDA, A. S. Observações sobre Amebas de Vida Livre potencialmente patogênicas. Tese de doutorado. Inst. Cienc. Biom. Univ. São Paulo. 1979.

FOWLER, M., CARTER, R. F. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba sp.* a preliminary report. **Br. Med. J.** 5464: 740 – 742, 1965.

FRIEDLAND, L. R., RAPHAEL, S. A., DEUTSCH, E. S., JOHAL, J., MARTYN, L. J., VISVESVARA, G. S., LISCHNER, H. W. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. **Pediatr Infect Dis J.** 11: 404 – 407, 1992.

GARATE, M., MARCHANT J., CUBILLOS I., CAO Z., KHAN, N. A., PANJWANI, N. In Vitro Pathogenicity of *Acanthamoeba* Is Associated with the Expression of the Mannose-Binding Protein. **Investigative Ophthalmology&Visual Science.** 47: 1056 – 1062, 2006.

GAST, R. J. Development of an *Acanthamoeba* -specific reverse dotblot and the discovery of a new ribotype. **J. Eukaryot. Microbiol.** 48: 609 – 615, 2001.

GAST, R. J., LEDEE, D. R., FUERST, P. A., BYERS, T. J. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. **J. Eukaryot. Microbiol.** 43: 498 – 504, 1996.

GORDON, S. M., STEINBERG, J. P., DUPUIS, M. H., KOZARSKY, P. E., NICKERSON, J. F., VISVESVARA, G. S. Culture isolation of *Acanthamoeba* species and leptomyxid amebas from patients with amebic meningoencephalitis, including two patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.** 15: 1024 – 1030, 1992.

HEWETT, M. K., ROBINSON, B. S., MONIS, P. T., SAINT, C. P. 2003. Identification of a new *Acanthamoeba* 18SrRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). **Acta Protozool.** 42: 325 – 219, 2003.

HORN, M., FRITSCH, T. R., GAUTOM, R. K., SCHLEIFER, K. H., WAGNER, M. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. Related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. **Environ. Microbiol.** 1: 357 – 367, 1999.

HUNT, S. J., REED, S. L., MATHEWS, W. C. E TORIAN, B. Cutaneous *Acanthamoeba* infection in the acquired immunodeficiency syndrome: response to multidrug therapy. **Cutis.** 56: 285 – 287, 1995.

HURT, M., APTE, S., LEHER, H., HOWARD, K., NIEDERKORN, J. E ALIZADEH, H. Exacerbation of *Acanthamoeba* keratitis in animals treated with anti-macrophage inflammatory protein 2 or antineutrophil antibodies. **Infect. Immun.** 69: 2988 – 2995, 2001.

IMBERT-BOUYER, S., MERLAUD, A., IMBERT, C., DANIAULT, G., RODIER, M. A mannose binding protein is involved in the adherence of *Acanthamoeba* species to inert surfaces. **Microbiology Letters.** 238: 207 – 211, 2004.

JAHNES, B., FULLMER, H. M., LI, C. P. Free-living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue cultures. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 96: 484 – 488, 1957.

JONES, B. R., VISVESVARA, G. S., ROBINSON, N. M. *Acanthamoeba* polyphaga keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. **Trans. Ophthalmol. Soc.** 95: 221 – 232, 1975.

KHAN, N. A., JARROLL, E. L., PANJWANI, N., CAO, Z., PAGET, T. A. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. **J. Clin. Microbiol.** 38: 2858 – 2861, 2000.

KHAN, N. A., JARROLL, E. L., PAGET, T. A. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Current Microbiol.** 43: 204 – 208, 2001.

KHAN, N.A. Pathogenicity, porfology and differentiation of *Acanthamoeba*. **Current Microbiology.** 43: 391 – 395, 2001.

KHAN, N. A., PAGET, T. A. Molecular tools for speciation and epidemiological studies of *Acanthamoeba*. **Curr Microbiol.** 44: 444 – 449, 2002.

KHAN, N. A., TAREEN, N. K. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. **Folia Parasitol.** 2: 97 – 104, 2003.

KIM, E. C., KIM, M. S. Bilateral *Acanthamoeba* Keratitis After Orthokeratology. **Cornea.** 2009.

KRAHENBUHL, O., TSCHOPP, J. Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Perforin-induced pore formation. **Immunol. Today.** 12: 399 – 402, 1991.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680 – 685, 1970.

LACKNER, P., BEER, R., BROESSNER, G., HELBOK, R., PFAUSLER, B., BRENNEIS, C., AUER, H., WALOCHNIK, J., SCHMUTZHARD, E. Acute granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis in an immunocompetent patient. **Neurocrit Care**. 12: 91 – 94, 2010.

LEE, W. B., GOTAY, A. Bilateral *Acanthamoeba* keratitis in synergeyes Contact Lens Wear: Clinical and Confocal Microscopy Findings. **Eye Contact Lens**. 2010.

LEHER, H., SILVANY, R., ALIZADEH, H., HUANG, J., NIEDERKORN, J.Y. Mannose induces the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. **Infect. Immun.** 66: 5 – 10, 1998.

LEVINE, N. D., CORLISS, J. O., COX, F. E. G., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B. M., LEEDALE, G .F., LOEBLICH, A. R., LOM, J., LYNN, D., MERINFELD, E. G., PAGE, F. C., POLJANSKI, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J., WALLACE, F.G. A newly revised Classification of the Protozoa. **J. Protozool.** 27: 37 – 58, 1980.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J, FARR A. L, RANDALL R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**. 193: 265 – 275, 1951.

MARCIANO CABRAL, F., CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. **Clin. Microbiol Rev**. 16: 273 – 307, 2003.

MARTINEZ, A. J., VISVESVARA. G. S. Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxida*. **Clin. Lab. Med**. 11: 861 – 872, 1991.

MARTINEZ, A. J., VISVESVARA, G. S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathol**. 7: 583 – 598, 1997.

MARTINEZ, J. M., GUERRA. A. E., GARCIA-TAMAYO, J., CÉSPEDES, G., GONZÁLES-ALFONZO, J., VIVESVARA, G. Granulomatous amebic encephalitis: a review and report of spontaneous case from Venezuela. **Acta Neuropathol.** 87: 430, 1994.

MERGERYAN, H. The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. **Rev. Infect. Dis.** 13: 390 – 391, 1991.

MORLET, N., DUGUID, G., RADFORD, C., MATHESON, M., DART, J. Incidence of *Acanthamoeba* keratits associated with contact lens wear. **Lancet.** 350: 414 – 417, 1997.

MURAKAWA, G. J., MCCALMONT, T., ALTMAN, J., TELANG, G. H., HOFFMAN, M. D., KANTOR, G. R., BERGER, T.G. Disseminate acanthamebiasis in patients with AIDS. A report of five cases and a review of the literature. **Arch-Dermatol.** 131: 1291 – 1296, 1995.

NAGINGTON, J., WATSON, P. G., PLAYFAIR, T. J., MCGILL, J., JONES, B.R., STEELE, A.D. Amoebic infection of the eye. **Lancet.** 1537 – 1540, 1974.

NEFF, R. J., NEFF, R. H. The biochemistry of amoebic encystment. Symp. **Soc. Exp. Biol.** 23: 51 – 81, 1969.

NIEDERKORN, J.Y., ALIZADEH, H., LEHER, H., McCULLEY, J.P. The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Springer Semin. Immunopathol.** 21: 147-160, 1999.

NIEDERKORN, J. Y. The role of the innate and adaptive immune responses in *Acanthamoeba* keratitis. **Arch. Immunol. Ther. Exp.** 50: 53 – 59, 2002.

OBEID W. N.; ARAÚJO R.; VIEIRA L. A.; MACHADO M. A. C. Ceratite bilateral por *Acanthamoeba* – Relato de caso. **Arq Bras Oftalmol.** 66: 876 – 80, 2003.

O'FARRELL P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. **J Biol Chem.** 250: 4007 – 4021, 1975.

PANJWANI, N.; ZHAO, Z.; BAUM, J.; PEREIRA, M. & ZAIDI, T. *Acanthamoebae* bind to glycolipids of rabbit corneal epithelium. **Infect. Immun.** 60: 3460 – 3463, 1992.

PANJWANI N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* Keratitis. Departments of Ophthalmology and Biochemistry, and The New England Eye Center, Tufts. University School of Medicine, Boston, Massachusetts. Manuscrito do autor publicado pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH), 2010.

PAGE, F.C. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. **J. Protozool.** 14: 709 – 724, 1967.

PAGE, F.C. *Rasculus ithacus* Hawes, 1963 (Amoebida, Flabellidae) and the amphizoic tendency in amoebae. **Acta Protozoology.** 13: 143 – 154, 1974.

PELLEGRIN, J. L., ORTEGA-BARRIA, E., BARZA, M., BAUM, J., PEREIRA, M.E. Neuraminidase activity in *Acanthamoeba* species trophozoites and cysts. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 32: 3061 – 3066, 1991.

PETTIT, D. A., WILLIAMSON, J., CABRAL, G. A., MARCIANO-CABRAL, F. In vitro destruction of nerve cell cultures by *Acanthamoeba* spp.: a transmission and scanning electron microscopy study. **J. Parasitol.** 82: 769 – 777, 1996.

PIDHERNEY, M. S., ALIZADEH, H., STEWART, G .L., MCCULLEY, J. P., NIEDERKORN, J. Y. In vitro and in vivo tumoricidal properties of a pathogenic/free-living amoeba. **Cancer Lett.** 72: 91 – 98, 1993.

PRESTON, T. M., KING, C. A. Amoeboid locomotion of *Acanthamoeba castellanii* with special reference to cell-substratum interactions. **J. Gen. Microbiol.** 130: 2317 – 2323, 1984.

PUSSARD, M., PONS, R. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**. 13: 557 – 610, 1977.

RADFORD, C. F., LEHMANN, O. J., DARK, J. K. *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992-6. National *Acanthamoeba* Keratitis Study Group. **Br. J. Ophthalmol.** 82: 1387 – 1392, 1998.

RAPPSILBER J., MANN, M. What does it mean to identify a protein in proteomics? **TRENDS Biochem Sci.** 27: 74 – 78, 2002.

ROCHA-AZEVEDO, B., COSTA E SILVA-FILHO, F. Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga*: analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. **Arch. Microbiol.** 188: 441 – 449, 2007.

ROCHA-AZEVEDO, B., TANOWITZ, H., B., MARCIANO-CABRAL, F. Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. **F.Interdiscip Perspect Infect Dis.** 25: 1406, 2009.

ROWBOTHAM, T. J. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. **J. Clin. Pathol.** 33: 1179 – 1183, 1980.

SADAKA, H. A., EMAM, E. E. Is the intestinal tract a portal of entry for *Acanthamoeba* infection? **J. Egypt. Soc. Parasitol.** 31: 781 – 790, 2001.

SANGRUCHI, T., MARTINEZ, A. J., VISVESVARA, G.S. Spontaneous granulomatous amebic encephalitis: report of four cases from Thailand. Southeast Asian. J. Trop. Med. **Public Health.** 25: 309 – 373, 1994.

SARPARANTA, K., LINDBOHM, N., TERVO, T., TUISKU, I., JOKIRANTA. S. *Acanthamoeba* keratitis. **Duodecim.** 125: 1639 – 46, 2009.

SCHAUDIN, F. Untersuchungen Über die Fortlanzung der Rhizopoden. **Arb. Kais. Gesundheitsamte**. 19: 547 – 576, 1903.

SCHUSTER, F. L. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. **Clinical Microbiology Reviews**. 15: 342 – 354, 2002.

SCHUSTER, F. L., VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for parasitology**. 34: 1001 – 1027, 2004.

SCHROEDER, J. M, BOOTON, G. C, HAY, J., NISZL, I. A, SEAL, D. V, MARKUS, M. B, FUERST, P. A, BYERS, T. J. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. **Journal of Clinical Microbiology** 39: 1903 – 1911, 2001.

SHARMA P. P., GUPTA, P., MURALI, M. V., RAMACHANDRAN, V. G. Primary amebic meningoencephalitis caused by *Acanthamoeba*: successfully treated with cotrimoxazole. **Indian Pediatr**. 30: 1219 – 1222, 1993.

SINGHAL, T., A. BAJPAI, V. KALRA, S. K. KABRA, J. C. SAMANTARAY, G. SATPATHY, GUPTA, A. K. Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials. **Pediatr. Infect. Dis. J.** 20: 623 – 627, 2001.

STAPLETON, F., OZKAN, J., JALBERT, I., HOLDEN, B. A., PETSOGLOU, C., MCCLELLAN, K. Contact Lens-Related *Acanthamoeba* Keratitis. **Optom Vis Sci**. 2009.

STEHR-GREEN, J.K., BAILEY, T.M., VISVESVARA, G. S. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. **Am. J. Ophthalmol**. 107: 331- 336, 1989.

STOTHARD, D. R., SCHROEDER-DIEDRICH, J. M., AWWAD, M. H., GAST, R. J., LEDEE, D. R., RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S., DEAN, C. L., FUERST, P. A., BYERS, T.J. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **J. Euk. Microbiol.** 45: 45 – 54, 1998.

STRARFORD, M. P., GRIFFITHS. Variations in the properties and morphology of cyst of *Acanthamoeba castellanii*. **J. Gene. Microbiol.** 108: 33 – 37, 1978.

TAYLOR, W. M., PIDHERNEY, M. S., ALIZADEH, H., NIEDERKORN, J.Y. *In vitro* characterization of *Acanthamoeba castellanii* cytopathic effect. **J. Parasitol.** 81: 603 – 609, 1995.

TONEY, D. M., MARCIANO-CABRAL, F. Resistance of *Acanthamoeba* species to complement lysis. **J. Parasitol. Apr.** 84: 338 – 344, 1998.

TORNO, M. S., BABAPOUR, J. R., GUREVITCH, A. M., WITT, D. Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. **J. Am. Acad. Dermatol.** 42: 351 – 354, 2000.

TURNER, M. L., EMMA, J., COCKERELL HELEN, M., BRERETON PAUL, R., BADENOCH MELINDA, T., DOUGLAS, J., COSTER KERYN, A., WILLIAMS, A. Antigens of selected *Acanthamoeba* species detected with monoclonal antibodies. **International Journal for Parasitology.** 35: 981 – 990, 2005.

VAN KLINK, F., ALIZADEH, H., STEWART, G. L., PIDHERNEY, M. S., SILVANY, R. E., MCCULLEY, J. P., NIEDERKORN, J. Y. Characterization and pathogenic potential of a soil isolate and an ocular isolate of *Acanthamoeba castellanii* in relation to *Acanthamoeba* keratitis. **Curr. Eye. Res.** 11: 1207 – 1220, 1992.

VAN KLINK, F., TAYLOR, W. M., ALIZADEH, H., JAGER, M. J., VAN ROOIJEN, N., NIEDERKORN, J. Y. The role of macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 37: 1271 – 1281, 1996.

VESALOUMA, M., KALSO, M., JOKIPII, L., WARHURST, D., PONKA, A., TERVO, T. Microbiological quality in Finnish public swimming pools and whirlpools with special reference to free living amoebae: a risk factor for contact lens wearers? **Br. J. Ophthalmol.** 79: 178 – 181, 1995.

VISVESVARA, G. S. Classification of *Acanthamoeba*. **Rev Infect Dis.** 5: 369 – 372, 1991.

VISVESVARA, G. S., MOURA, H., SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 50: 1 – 26, 2007.

VISVESVARA, G. S., SHOFF, M. E., SRIRAM, R., BOOTON, G. C., CRARY, M., FUERST, P. A., HANLEY, C. S., GARNER, M. M. Isolation, morphologic, serologic and molecular identification of *Acanthamoeba* T4 genotype from the liver of a Temminck's tragopan (*Tragopan temminckii*). **Vet Parasitol.** 2010.

VISVESVARA, G. S., SCHUSTER, F. L., MARTINEZ, A. J. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Eucaryot. Microbiology.* 40: 504 – 514, 1993.

VISVESVARA, G. S., SHER-GREEN, J. Epidemiology of free-living ameba infection. **J. Protozool.** 37: 25 – 33, 1990.

WALOCHNIK, J., HASSL, A., SIMON, K., BENYR, G., ASPOCK, H. Isolation and identification by partial sequencing of the 18S ribosomal gene of free-living amoebae from necrotic tissue of *Basilliscus plumifrons* (Sauria: Iguanidae). **Parasitol. Res.** 85: 601 – 603, 1999.

WALOCHNIK, J., OBWALLER, A., ASPOCK, H. Correlations between Morphological, Molecular Biological, and Physiological Characteristics in Clinical and Nonclinical Isolates of *Acanthamoeba* spp. **Applied and Environmental Microbiology.** 66: 4408 – 4413, 2000.

WALOCHNIK, J., OBWALLER, A., ASPOCK, H. Immunological interstrain crossreactivity correlated to 18S rDNA sequence types in *Acanthamoeba* spp. **Int. J. Parasitol.** 31: 163 – 167, 2001.

WALOCHNIK, J., SOMMER, K., OBWALLER, A. E., SCHOBBER M. H., ASPOCK, H. Characterisation and differentiation of pathogenic and non pathogenic *Acanthamoeba* strains by their protein and antigen profiles. **Parasitology Research.** 92: 289 – 298, 2004.

YANG, Z., CAO, Z., PANJWANI, N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis: Carbohydrate-mediated host-parasite interactions. **Infection and immunity.** 65: 439 – 445, 1997.

YOUNG, J. D., YOUNG, T. M., LU, L. P., UNKELESS, J. C., COHN, Z. A. Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. **J. Exp. Med.** 156: 1677 – 1690, 1982.